

LE RÔLE DU CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DES microARN DANS LA MISE EN
PLACE DE LA RÉSISTANCE HAUTEMENT SPÉCIFIQUE CHEZ *ARABIDOPSIS*
THALIANA.

par

Marie Bernadette Dibor Diam

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2019

Le 25 juillet 2019

*le jury a accepté le mémoire de Madame Marie Bernadette Dibor Diam
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Kamal Bouarab
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Benoit Leblanc
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Alexandre Maréchal
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Les plantes sont en permanence confrontées à plusieurs défis dans leur environnement, à savoir les stress biotiques et abiotiques. Pour relever ces défis, elles ont développé un premier niveau de résistance basale appelée PTI (Immunité induite par les PAMP) qui est activée par la présence de motifs moléculaires associés aux pathogènes et perçus par des récepteurs extracellulaires les PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Cette première résistance est souvent contournée par les pathogènes. Ainsi, les plantes se voient dans l'obligation d'activer un deuxième niveau de résistance appelée ETI (*Effector Triggered Immunity*) qui se déclenche suite à la reconnaissance par des récepteurs spécifiques, des protéines virulentes sécrétées par les agents pathogènes. Un autre type de résistance retrouvé est médié par les petits ARN non codants, appelés ARN d'interférence (ARNi). Les ARNi peuvent emprunter plusieurs voies. La voie qui nous intéresse dans ce projet est celle des microARN (miARN) qui favorise le contrôle de l'expression des gènes endogènes impliqués dans la réponse de défense de la plante. De ce fait, il est important pour la plante de mettre en place un système permettant le contrôle de l'homéostasie des miARN en présence d'agents pathogènes pour une meilleure immunité. En effet, les plantes disposent de protéines possédant une activité exonucléasique, appelées SDN (*Small RNA degrading nucleases*) qui contrôlent l'accumulation de ces miARN.

Dans la présente étude, on a démontré que les protéines SDN sont importantes pour la résistance déclenchée chez *Arabidopsis thaliana* contre la souche de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 exprimant l'effecteur AvrPphB (*Pseudomonas phaseolicola*B). Cet effecteur AvrPphB est une protéase qui cible PBS1 (*AvrPphB SUSCEPTIBLE 1*) et bloque directement la signalisation immunitaire du PTI. Cette kinase est sous le contrôle de la protéine de résistance RPS5 (*Resistance to Pseudomonas Syringae5*) qui est donc activée suite

à ce clivage. Cependant, l'augmentation et la répression de l'accumulation de cette protéine de résistance peuvent dépendre de plusieurs facteurs. De plus l'activation de la protéine de résistance RPS5 par l'effecteur AvrpphB active la voie de signalisation de l'AS (Acide salicylique), une hormone de défense très importante dans l'activation de gène de défenses.

Par la suite, on a démontré que les protéines SDN1 et SDN2 contrôlent l'accumulation de l'AS, mais aussi le niveau d'expression de RPS5 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 exprimant l'effecteur AvrPphB. Ensuite en utilisant le programme psRNA Target, le miR5020 est prédit cliver directement le transcrit RPS5. Mes résultats montrent que le niveau de miR5020 corrèle négativement avec le niveau de transcrit RPS5 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 exprimant l'effecteur AvrPphB. Enfin, ce projet de recherche a permis de découvrir une voie de défense importante chez *Arabidopsis* nous permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes de défense des plantes.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*, *Pst* DC3000, effecteur, ETI, protéine de résistance, RPS5, miARN, protéine SDN.

REMERCIEMENTS

J'aimerais témoigner toute ma gratitude à mon directeur de recherche le professeur Kamal Bouarab qui m'a accordé sa confiance en me permettant d'entreprendre mes recherches dans son laboratoire. Sa rigueur scientifique, sa patience, son soutien inestimable m'ont été d'une grande utilité. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité. Mes remerciements s'adressent également à mes deux conseillers, le professeur Alexandre Maréchal et le professeur Benoit Leblanc pour leur soutien permanent tout au long de mon cheminement. C'est d'ailleurs pour moi un réel plaisir d'avoir côtoyé les membres de mon laboratoire Rocio Gonzalez-Lamothe, Fabrice Betoudji et Taha Abd El Rahman que je remercie de leur aide précieuse et de leurs conseils judicieux, mention spéciale à Refka Ajmi qui était comme une sœur. J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires le CRSNG et le centre SÈVE pour l'appui financier de ma maîtrise. Je voudrais exprimer ma gratitude envers mes amis de Sherbrooke spécialement à Fatimah Binaté pour le soutien moral et intellectuel tout au long de mes études.

Je souhaite dédier ce mémoire à tous les membres de ma famille. Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, qui ont été pour moi un modèle et n'ont cessé de m'encourager. Je remercie en particulier mon grand frère pour son soutien financier inestimable de mes études. Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon cher époux Théodore Samoura pour sa patience, et son affectueux soutien tout au long de mon parcours, que notre fils Charo Michel continue d'illuminer notre vie.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| SOMMAIRE..... | iv |
| REMERCIEMENTS | vi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | ix |
| LISTE DES FIGURES | xiii |
| Chapitre 1 | 1 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 1 |
| 1.1 Les mécanismes de résistance de la plante face aux phytopathogènes | 2 |
| 1.1.1 Définition et type d'agent phytopathogène | 3 |
| 1.1.2 La résistance passive ou innée chez la plante..... | 6 |
| 1.1.3 La résistance active ou adaptative chez la plante | 7 |
| 1.1.3.1 La résistance basale | 8 |
| 1.1.3.2 La résistance spécifique induite par les effecteurs | 9 |
| 1.1.3.2.1 Les effecteurs et les facteurs Avr (protéine d'avirulence)..... | 10 |
| 1.1.3.2.2 Les protéines (R) et la reconnaissance R-Avr | 12 |
| 1.1.4 Les réponses de défenses induites chez les plantes | 15 |
| 1.1.4.1 Réaction hypersensible | 15 |
| 1.1.4.2 Protéines PR et la famille de protéines PR-1..... | 16 |
| 1.1.4.3 Les hormones de défense chez les plantes..... | 18 |
| 1.1.4.3.1 L'acide salicylique..... | 19 |
| 1.1.4.3.2 Les jasmonates et l'éthylène..... | 21 |
| 1.1.5 Mobilité du signal de la SAR et résistance systémique induite..... | 21 |
| 1.2 L'ARN interférence ou ARNi | 23 |
| 1.2.1 Principe général de l'ARNi | 24 |
| 1.2.2 La voie antivirale de l'ARNi | 25 |
| 1.2.3 Voie des miARN | 27 |
| 1.2.3.1 Rôles des miARN chez les plantes | 29 |
| 1.2.3.1.1 Rôles des miARN dans la croissance et le développement des plantes | 30 |
| 1.2.3.1.2 Rôles des miARN dans l'immunité des plantes. | 31 |
| 1.2.3.2 Régulation de l'accumulation des microARN..... | 32 |
| 1.2.3.2.1 Les protéines SDN..... | 32 |
| 1.3 Objectifs du projet de recherche | 35 |
| Chapitre 2 | 36 |
| LE ROLE DU CONTROLE DE L'HOMEOSTASIE DES microARN DANS LA MISE EN PLACE DE LA RESISTANCE HAUTEMENT SPECIFIQUE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> | 36 |
| Présentation de l'article | 36 |
| Résumé | 38 |
| 2.1 Introduction | 39 |
| 2.2 Résultats | 41 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1 Rôle des protéines SDN dans la mise en place de l'immunité induite par la voie ETI | 41 |
| 2.2.2 Caractérisation des transcrits et des miARN régulés par l'ETI et qui sont sous contrôle des protéines SDN. | 46 |
| 2.3 Discussion..... | 51 |
| 2.4 Matériels et méthodes..... | 54 |
| 2.4.1 Matériel végétal et conditions de croissance | 54 |
| 2.4.2 Culture des souches de <i>Pseudomonas</i> (<i>Pst</i> DC3000)..... | 55 |
| 2.4.3 Infection avec les souches Avirulentes de <i>Pst</i> DC3000 | 55 |
| 2.4.4 Échantillonnage et croissance bactérienne 4 jours | 56 |
| 2.4.5 Extraction des protéines et Immunobuvardage de type western | 56 |
| 2.4.6 Dosage de l'acide salicylique | 57 |
| 2.4.7 Extraction d'ARN, synthèse de l'ADNc et qPCR..... | 58 |
| 2.4.8 Extraction des miARN, synthèse de l'ADNc et qPCR..... | 59 |
| Remerciements | 60 |
| Références | 60 |
| Annexes | 63 |
| Chapitre 3 | 73 |
| DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION..... | 73 |
| BIBLIOGRAPHIE | 76 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|--|
| 24hai | <i>24h après infection</i> |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ADF | <i>Actin-Depolymerizing Factor</i> |
| ADP | <i>Acide désoxyribonucléique</i> |
| AGO | <i>Argonaute</i> |
| AJ | <i>Acide Jasmonique</i> |
| ARN | <i>Acide ribonucléique</i> |
| ARNdb | <i>ARN double Brin</i> |
| ARNi | <i>ARN d'interférence</i> |
| ARNm | <i>ARN messenger</i> |
| ARNsb | <i>ARN simples-brin</i> |
| ARNse | <i>ARN secondaire</i> |
| AS | <i>Acide salicylique</i> |
| ATP | <i>Adénosine triphosphate</i> |
| Avr | <i>protéine d'avirulence</i> |
| AvrPphB | <i>Pseudomonas phaseolicolaB</i> |
| AvrRpm1 | <i>Pseudomonas syringae pv. Maculicola</i> |
| AvrRps4 | <i>Effecteur de Pseudomonas syringae</i> |
| BAK1 | <i>BRI1-Associated Kinase 1</i> |
| BIK1 | <i>Botrytis-induced kinase 1</i> |
| BSA | <i>Albumine de Sérum bovin</i> |
| BTH | <i>benzo-(1,2,3) -thiadiazol-7-carbothiate de S-méthyl</i> |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| CC | <i>coiled-coil</i> |
| Col-0 | <i>Columbia-0</i> |
| Cq | <i>Cycle seuil</i> |

| | |
|-----------|--|
| DAMP | <i>Motif moléculaire associé aux dommages</i> |
| DCL | <i>Dicer</i> |
| DO | <i>Densité optique</i> |
| EDS1 | <i>Enhanced disease susceptibility</i> |
| Eri-1 | <i>Enhanced RNAi-1</i> |
| ET | <i>Éthylène</i> |
| ETI | <i>Effector Triggered Immunity</i> |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| HEN1 | <i>HUA enhancer 1</i> |
| HESO1 | <i>HEN1 SUPPRESSOR1</i> |
| HST | <i>HASTY</i> |
| ICS | <i>Isochorismate synthase</i> |
| INA | <i>Acide 2,6-dichloroisonicotinique</i> |
| ISR | <i>résistance systémique induite</i> |
| KB | <i>King B</i> |
| LAR | <i>Résistance acquise locale</i> |
| LOX | <i>Lipoxygénases</i> |
| LRR | <i>Répétitions riches en leucines</i> |
| M. oryzae | <i>Magnaporthe oryzae</i> |
| MAMP | <i>Microbial-Associated Molecular Patterns</i> |
| MAP | <i>Mitogen-Activated Protein</i> |
| MeSA | <i>Méthyl salicylate</i> |
| miARN | <i>microARN</i> |
| NB | <i>Liaison nucléotides</i> |
| NO | <i>oxyde nitrique</i> |
| NPR1 | <i>Non-expressor of Pathogenesis-Related genes1</i> |
| OMS | <i>Organisation mondiale de la santé</i> |
| PAD4 | <i>Phytoalexin deficient 4</i> |
| PAL | <i>Phenylalanine ammonia lyase</i> |

| | |
|-------------------|---|
| PAMP | <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> |
| PAZ | <i>PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE</i> |
| PBL1 | <i>AvrPphB sensitive 1-like 1</i> |
| PBL2 | <i>AvrPphB sensitive 1-like 2</i> |
| PBS1 | <i>AvrPphB Susceptible 1</i> |
| PCD | <i>Mort cellulaire programmée</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PR | <i>Relié à la pathogenèse</i> |
| pri-miARN | <i>miARN primaire</i> |
| PRR | <i>Pattern Recognition Receptors</i> |
| <i>Pst</i> DC3000 | <i>Pseudomonas syringae pv tomato DC3000</i> |
| PTI | <i>Immunité induite par les PAMP</i> |
| RDR _v | <i>Viral RNA Dependent RNA Polymerase</i> |
| RH | <i>Réaction d'hypersensibilité</i> |
| RIN4 | <i>RPM1 INTERACTING4</i> |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| ROS | <i>Espèces activées de l'oxygène</i> |
| RPM1 | <i>Resistance to Pseudomonas Maculicola1</i> |
| RPS4 | <i>Resistance to Pseudomonas Syringae4</i> |
| RPS5 | <i>Resistance to Pseudomonas Syringae5</i> |
| SAG | <i>Salicylique acid glucoside</i> |
| SAR | <i>Résistance systémique acquise</i> |
| SDN | <i>Small RNA-degrading nucleases</i> |
| TGA | <i>TGACG-BINDING FACTORs</i> |
| TIR | <i>Récepteur Toll interleukine</i> |
| TMV | <i>Virus de la mosaïque du tabac</i> |
| TTSS | <i>Type Three Secretion System)</i> |
| WRKY | <i>Facteur de transcription de plante</i> |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|-----------|--|---|
| Tableau 1 | Exemples de gènes de pathogénicité | 5 |
|-----------|--|---|

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Reconnaissance des PAMP par les récepteurs PRR à la surface cellulaire | 9 |
| Figure 2. Inhibition de la voie PTI par les effecteurs et activation de la voie ETI..... | 11 |
| Figure 3. Activation de la voie ETI avec des protéines de résistance et des effecteurs différents..... | 14 |
| Figure 4. Réponse d'hypersensibilité contre une souche bactérienne avirulente chez <i>Arabidopsis</i> | 16 |
| Figure 5. Expression du gène codant pour la protéine PR1 médiée par les protéines NPR1, TGA1 et TGA2..... | 18 |
| Figure 6. Différentes voies de synthèse de l'AS | 20 |
| Figure 7. Résistance systémique acquise après infection par des agents pathogènes et activation des voies PTI et ETI | 23 |
| Figure 8. Mécanisme général de l'ARNi..... | 25 |
| Figure 9. Infection de la plante par un virus à ADN simple brin suivi d'une immunité locale et système acquise par la plante. | 27 |
| Figure 10. Voie de synthèse des miARN | 29 |
| Figure 11. Action des protéines SDN sur l'ensemble de transcrits chez la plante | 34 |
| Figure 12. Rôle des protéines SDN dans la mise en place de la résistance..... | 42 |
| Figure 13. Les protéines SDN contrôlent l'accumulation de la PR1 induite par RPS5/AvrPphB | 44 |
| Figure 14. Les protéines SDN contrôlent l'accumulation de l'AS dans le système RPS5/AvrPphB..... | 45 |
| Figure 15. SDN1/2 contrôlent l'accumulation de RPS5..... | 47 |
| Figure 16. SDN1/2 ne régulent pas l'accumulation des transcrits PBS1 et ses homologues | 48 |
| Figure 17. SDN1/2 ne régulent pas les niveaux d'accumulation de ADF4, un facteur de transcription qui régule l'expression de RPS5. | 49 |
| Figure 18. Le niveau du miR5020 est contrôlé par les protéines SDN1/2 en réponse à l'infection par la souche de <i>P. syringae</i> exprimant l'effecteur AvrPphB | 51 |

Chapitre 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le système de défense des plantes se différencie de celui des animaux par l'absence de cellules spécialisées, comme les lymphocytes, pouvant assurer la défense de l'organisme (Dodds et Rathjen, 2010; Freeman et Beattie, 2008). De plus, leur nature immobile et passive les rend plus vulnérables aux agresseurs de type biotique (microorganismes phytopathogènes, insectes ravageurs, herbivores) et abiotique (froid, gel, sécheresse, etc.). Ainsi, ces dangers et menaces environnementaux mènent à des énormes pertes de récoltes comprises entre 10 % et 30 % ou même plus, dépendamment de la localisation de ces végétaux (Roven, 2001). Avec une augmentation continue de la démographie et l'amenuisement des réserves mondiales de denrées, les agriculteurs devront faire face à deux défis. Le premier défi se trouve au niveau de l'augmentation de la production face à la population qui accroit rapidement. Le second défi lui concerne la lutte contre le stress surtout celui causé par les phytopathogènes tels que les bactéries, les virus, les champignons responsables des maladies chez les plantes. En outre, pour protéger les plantes de ces interactions avec les agents pathogènes, les agriculteurs utilisent de manière excessive des produits chimiques synthétiques tels que les pesticides (Benhamou et Rey, 2012b). Ces produits chimiques sont aussi utilisés par les autorités sanitaires pour lutter contre divers vecteurs propageant des maladies comme le paludisme (Raslan *et al.*, 2018). Même si ces produits jouent un rôle important dans la prévention des maladies végétales et dans la lutte antiparasitaire, il reste néanmoins un risque grave pour la santé humaine et l'environnement pouvant entraîner une perte de biodiversité selon la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé). En effet, ces pesticides répandus sur les cultures sont des sources de contamination aussi bien pour les sols que pour les milieux aquatiques. Mais aussi, ceux-ci représentent une grande source de toxicité pour l'être humain (Lebailly *et al.*, 2007) pouvant

entraîner des symptômes de diarrhée allant jusqu'au cancer (cancers de la prostate, du pancréas et la leucémie). Face à ces enjeux, il est donc nécessaire de mener des recherches sur les mécanismes naturels de défenses et de résistances des plantes, et ainsi d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies naturelles de lutte contre ces phytopathogènes.

Il est connu que les plantes perçoivent et réagissent, aux signaux de stress induits par des agents pathogènes (Benhamou et Rey, 2012), de manière directe ou indirecte, par la synthèse de molécules structurales et/ou biochimiques grâce à l'activation de gènes de défense. Ainsi, grâce à des chercheurs, il a été possible d'identifier la réaction des plantes suite à une interaction avec des agents pathogènes comme étant un mécanisme naturel de défense immunitaire. Cette découverte contribuerait à une alternative contre l'utilisation des pesticides favorisant des pratiques plus durables et plus respectueuses de l'environnement.

1.1 Les mécanismes de résistance de la plante face aux phytopathogènes

Durant toute sa vie, la plante est exposée à une grande diversité d'agents pathogènes nuisant à son développement et ayant un impact significatif sur sa physiologie. Elle doit donc s'adapter et développer des mécanismes efficaces pour contourner les différentes stratégies favorisant une infection par un agent phytopathogène (Freeman et Beattie, 2008)

1.1.1 Définition et type d'agent phytopathogène

Un agent phytopathogène est un bioagresseur ayant la capacité de développer des mécanismes moléculaires leur permettant d'infecter leur hôte. Ainsi, selon leur mode de nutrition et les molécules sécrétées (El Oirdi *et al.*, 2011), on distingue trois types d'agents pathogènes :

-Les agents pathogènes nécrotrophes : qui sécrètent des enzymes et des toxines (Tableau1). Les enzymes ont pour mission de dégrader la paroi cellulaire considérée comme source de carbone. D'ailleurs, des analyses récentes de séquençage génomique dans ce groupe ont révélé plus de 100 gènes potentiels codant pour des enzymes actives capables de dégrader les polymères de la paroi des cellules végétales (Schafer, 1994). Parmi ceux-ci, *B.cinerea* (*Botrytis cinerea*), un champignon nécrotrophe, est le plus étudié en raison de sa large gamme d'hôtes et de son potentiel à dégrader des glucides (Kamaruzzaman *et al.*, 2019). Une fois la paroi cellulaire de son hôte détruite, les toxines sécrétées (Tableau 1) par ces agents entraîneront la mort de la cellule en interférant avec les voies de signalisation des plantes. Cette mort cellulaire permet ainsi aux agents nécrotrophes de puiser les éléments nécessaires à leur métabolisme (Mbengue *et al.*, 2016; Mengiste, 2012). Cependant, certaines plantes possèdent la capacité de reconnaître les toxines sécrétées par ces agents pathogènes et ainsi les éliminer de son organisme (Glazebrook, 2005).

-Les agents pathogènes biotrophes: contrairement aux nécrotrophes, ces agents pathogènes ne tuent pas leurs cellules hôtes (El Oirdi *et al.*, 2011 ; Wildermuth *et al.*, 2017), mais tirent profit des cellules vivantes. Ces agents pathogènes biotrophes possèdent une réserve d'enzymes hydrolytiques plus petite que celle rencontrée chez les agents pathogènes nécrotrophes, Ce qui est conforme à leur mode de vie biotrophique obligatoire (Tableau 1). Ils ont ainsi développé des structures tels que les haustoria qui sont des hyphes leur permettant d'envahir leur hôte sans les tuer afin de profiter de leur métabolisme comme moyen de survie

(Andersen *et al.*, 2018 ; Mengiste, 2012). De même, ils modifient les processus de signalisation chez l'hôte pour retarder la mort cellulaire qui est la stratégie de défense la plus efficace de la plante vis-à-vis des agents pathogènes biotrophes. C'est d'ailleurs le cas de l'agent pathogène oomycète *H. arabidopsidis* (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) qui empêche la sécrétion d'hormones de défense chez *Arabidopsis* (Koornneef *et al.*, 2008).

-Les agents hémi-biotrophes : ceux-ci détiennent un mode de vie à la fois biotrophe et nécrotrophe (Häffner *et al.*, 2015 ; Mengiste, 2012). En effet, ces agents tirent leur énergie du métabolisme de la cellule végétale vivante comme le font les biotrophes. En plus ces pathogènes possèdent la capacité de détruire leur hôte grâce à des gènes codants pour des enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire ; ceci faisant d'eux des agents nécrotrophes. Un exemple d'agent le plus cité dans la littérature est *P. syringae* (*Pseudomonas syringae*) reconnu pour sa capacité d'interactions diverses et spécifiques avec des plantes (Melotto *et al.*, 2008).

Tableau 1. Exemples de gènes de pathogénicité

| Gènes de pathogénicité | Rôle chez l'hôte (plante) |
|------------------------------|--|
| Endopolygalacturonases | dégradent la paroi cellulaire |
| pectate lyase codée par pelB | Dégrade les parois cellulaires/ Inhibe les réactions de défense |
| AKT3-2 | Hydratase / isomérase |
| CutA | Cutinase/ dégrade la cutine |
| Polygalacturonase | clive les liaisons α -1,4 de la pectine |
| AKTR - 2 | Impliqué dans la biosynthèse de toxine AK |
| AMT | Peptide synthase/ impliquée dans la synthèse de la toxine AM |
| TOXC | sous-unité β d'acide gras synthase |

Inspiré des auteurs Idnurm et Howlett (2001)

AKT = AK-toxine ; AMT= AM-toxine ; TOXC = Toxine ; CutA= Cutinase

Ainsi donc, lorsqu'une infection est réussie par un agent pathogène, la plante est dite sensible et le pathogène est dit virulent. Cette relation se définit comme compatible. Dans le cas contraire lorsque la plante active les réponses de défense elle est dite résistante et l'agent pathogène est dit avirulent (Guest et Brown, 1997). La relation qui dérive de cette interaction est ainsi appelée interaction incompatible (Hammond-Kosack et Jones, 1996). Ces deux interactions de comptabilité et d'incompatibilité existantes permettent de définir l'avenir de

ces deux acteurs (Otulak-Kozieł *et al.*, 2018). Dans la relation de compatibilité, la plante est tolérante tandis que dans une relation d'incompatibilité la plante active ses moyens de défense (Otulak-Kozieł *et al.*, 2018).

1.1.2 La résistance passive ou innée chez la plante

La résistance passive est une immunité naturelle retrouvée chez les plantes pour faire face aux agresseurs externes. Ce type de résistance est un processus constitutif et correspond à la défense initiale des plantes. Elle permet l'établissement d'une relation incompatible entre la plante et le pathogène (Mysore et Ryu, 2004). Cette première ligne de défense est normalement constituée de composés qui sont déjà présents chez la plante avant toute infection par des agents pathogènes et peuvent être structuraux ou chimiques.

-Les barrières structurales constitutives : on peut aussi les définir comme des barrières physiques (Freeman et Beattie, 2008). Ces défenses sont les premiers obstacles auxquels font face les agents pathogènes avant de pouvoir envahir leurs hôtes. Ainsi donc, la première structure de défense de la cellule végétale est sa paroi pectocellulosique qui forme une sorte de squelette externe rigide pour protéger la plante de ses envahisseurs (Guest et Brown, 1997 ; Nürnberger *et al.*, 2004). Cette paroi peut néanmoins être traversée de manière passive par des agents pathogènes comme les virus, les bactéries et les champignons (Dodds et Rathjen, 2010). Ces derniers profitent des blessures engendrées entre autres par les oiseaux ou les piqûres d'insectes pour pénétrer la cellule. D'autre part, les champignons ont la capacité de sécréter des enzymes hydrolysant la paroi afin de la traverser (Tableau 1). Une autre barrière de défense structurale est la cuticule qui est la barrière la plus efficace pour la défense structurale passive. Cette structure est composée de cutine hydrophobe et de cire lui conférant une force mécanique et une résistance aux attaques des agents pathogènes (Freeman et Beattie,

2008 ; Guest et Brown, 1997). D'autres structures comme les cellules de garde sont responsables de l'ouverture des stomates empêchant le passage des agents pathogènes. De même, une autre structure impliquée est le trichome qui forme des poils agglutinants et empêche l'agent pathogène d'infecter la plante (Freeman et Beattie, 2008 ; Guest et Brown, 1997).

- **Les substances chimiques** : ce sont des métabolites secondaires préformés au sein desquels se retrouvent des molécules antimicrobiennes appelées phytoanticipines. Ces composés se trouvent sous formes actives et/ou inactives (Benhamou et Rey, 2012) dans lesquels on retrouve les saponines qui ont des propriétés antimicrobiennes (Osbourn, 1996). On retrouve aussi, dans le groupe des phytoanticipines des composés phénoliques, les alcaloïdes et terpénoïdes qui sont des composés antibactériens et antifongiques dégradant la paroi bactérienne (Osbourn, 1996 ; Wittstock et Gershenzon, 2002).

Ainsi, l'immunité passive ou innée diminue les risques d'infection, mais peut par contre être déjouée par le pathogène. La plante est donc obligée d'induire d'autres mécanismes de résistance plus agressifs (Lepoivre, 2003).

1.1.3 La résistance active ou adaptative chez la plante

Cette résistance prend place lorsque la première ligne de défense est contournée par les agents pathogènes. Ces mécanismes de défense déclenchent plusieurs voies moléculaires qui dépendent de l'agent pathogène. Dans ce type de défense, l'immunité se distingue par deux niveaux : la résistance basale et la résistance spécifique.

1.1.3.1 La résistance basale

Concernant cette première voie de résistance, celle-ci est désignée sous le terme de PTI (Immunité induite par les PAMP) (Jones et Dangl, 2006). Cette voie est activée suite à la reconnaissance extracellulaire de motifs moléculaires caractéristiques aux agents pathogènes, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Figure 1) ou aux microbes, les MAMP (*Microbial-Associated Molecular Patterns*) (Henry *et al.*, 2011; Rovenich *et al.*, 2014). Il peut aussi arriver qu'en situation de danger, la plante perçoive des molécules issues de la dégradation de ses propres composants ou ceux du micro-organisme, les DAMP (motif moléculaire associé aux dommages) comme une alerte (Henry *et al.*, 2011). Ainsi, la reconnaissance des motifs moléculaires se fait à partir de récepteurs localisés au niveau de la membrane cellulaire, les PRR (*Pattern Recognition Receptors*) (Khan *et al.*, 2016). La plupart des PRR végétaux sont des kinases réceptrices transmembranaires (Figure 1), présentant pour la majorité des répétitions riches en leucines extracellulaires appelées LRR (répétitions riches en leucines) (Khan *et al.*, 2016).

Ainsi, chez les plantes, il existe plusieurs récepteurs de PAMP ou de MAMP. Il est possible de citer par exemple, le récepteur de la flagelline, codé par le gène FLS2 (*FLagellin Sensing 2*) et retrouvé chez *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2010). Le récepteur FLS2 reconnaît le peptide flagellaire bactérien flg22 et s'y lie à partir du domaine extracellulaire de type LRR. Suite à la liaison du peptide flagellaire au récepteur FLS2, celui-ci s'associe rapidement à des kinases de type co-récepteur comme BAK1 (*BRII-Associated Kinase 1*) (Figure 1), BIK1 (*Botrytis-induced kinase 1*), PBL1 (*AvrPphB sensitive 1-like 1*) et PBL2 (*AvrPphB sensitive 1-like 2*) (Lal *et al.*, 2018 ; Liang et Zhou, 2018 ; Ranf *et al.*, 2014). Ce complexe peptide récepteur peut aussi s'associer à une sous-famille de kinases cytoplasmiques semblables à des récepteurs appelés PBS1 (*AVRPPHB SUSCEPTIBLE 1*) (Chinchilla *et al.*, 2006). Cette reconnaissance entraîne l'activation d'une cascade de signalisations impliquant la voie des MAP kinases

(*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et des facteurs de transcription WRKY (facteur de transcription de plante) menant à l'activation et à l'expression des gènes de défense (Eulgem et Somssich, 2007). En général, la voie de PTI suffit pour bloquer l'infection, mais les agents pathogènes ont développé des moyens d'y échapper ou de la supprimer afin de proliférer. Ce qui nécessite l'activation d'une résistance plus spécifique et plus efficace chez la plante.

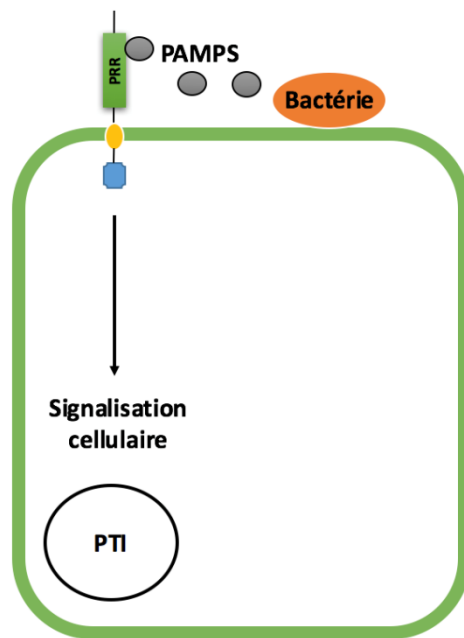


Figure 1. Reconnaissance des PAMP par les récepteurs PRR à la surface cellulaire

Modèle inspiré des auteurs Zamioudis et Pieterse (2012)

La présence de bactérie déclenche une signalisation cellulaire et la réponse PTI. Les récepteurs extracellulaires PRR jouent un rôle dans la reconnaissance des PAMP virulents délivrés par la bactérie.

1.1.3.2 La résistance spécifique induite par les effecteurs

Il s'agit d'une résistance génétique qui fait intervenir des protéines de résistance chez la plante et des protéines effectrices chez l'agent pathogène.

1.1.3.2.1 Les effecteurs et les facteurs Avr (protéine d'avirulence)

Les effecteurs sont des protéines virulentes apoplastiques ou cytoplasmiques sécrétées par des agents phytopathogènes colonisant en général l'apoplaste. C'est l'exemple de la bactérie *P. syringae* qui se multiplie dans les espaces intercellulaires (Katagiri *et al.*, 2002). Ces pathogènes sécrètent donc des protéines virulentes capables de cibler des composants de la voie de signalisation de PTI et ainsi supprimer l'immunité des plantes (Zhang *et al.*, 2010). Un exemple a été démontré par l'équipe de Zhang *et al.* (2010) avec la protéine effectrice AvrPphB (*Pseudomonas phaseolicola*B) sécrétée par *P. syringae* dans le cytoplasme d'*A. thaliana*. Les bactéries phytopathogènes utilisent un système de sécrétion de type III (TTSS, Type Three Secretion System) (Katagiri *et al.*, 2002; Truman *et al.*, 2006) pour sécréter les protéines effectrices dans le cytoplasme des cellules hôtes de la plante. Cependant d'autres agents pathogènes comme les champignons biotrophes et les oomycètes utilisent un système de sécrétion différent. En effet, ces agents pathogènes délivrent leurs effecteurs extra ou intracellulaires au moyen de vésicules d'infection et d'haustoria (Kamoun, 2006).

Ainsi, le rôle des effecteurs est de remobiliser des nutriments et d'inhiber des mécanismes de défense établis par la plante (Göhre et Robatzek, 2008). Pour atteindre ces deux objectifs, les agents pathogènes modifient leur nature et leur nombre d'effecteurs. Ils s'y prennent en éliminant soit leur production en effecteur ou en inhibant l'expression de leurs gènes par la modification de leur séquence protéique afin d'échapper à la reconnaissance de la plante (Ali et Bakkeren, 2011; Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Libault *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2006). Ainsi, lorsque les effecteurs ne sont pas reconnus, ils deviennent virulents et attaquent les mécanismes de résistance de la plante, plus principalement la voie de PTI (Figure 2). Les effecteurs peuvent aussi avoir comme rôle de mimer des toxines de la plante. Par exemple la coronatine produite par *P. syringae* peut réguler les réponses de défense de la plante ou mimer la production de phytohormone telle que l'AJ (Acide Jasmonique). Elle peut aussi inhiber la

voie de l'AS (Acide salicylique), un autre messager secondaire essentiel à la mise en place de l'immunité chez les plantes (Cui *et al.*, 2015).

Pour contrecarrer l'effet des effecteurs sur la voie de PTI, les plantes ont développé un deuxième type de réponse d'amplitude plus élevée appelé ETI (*Effector Triggered Immunity*) (Jones et Dangl, 2006). La voie ETI fait intervenir des protéines codées par des gènes de résistance (R) de la plante. Ces protéines de résistance reconnaissent spécifiquement ces effecteurs qui deviennent avirulents et bloquent la croissance des agents pathogènes.

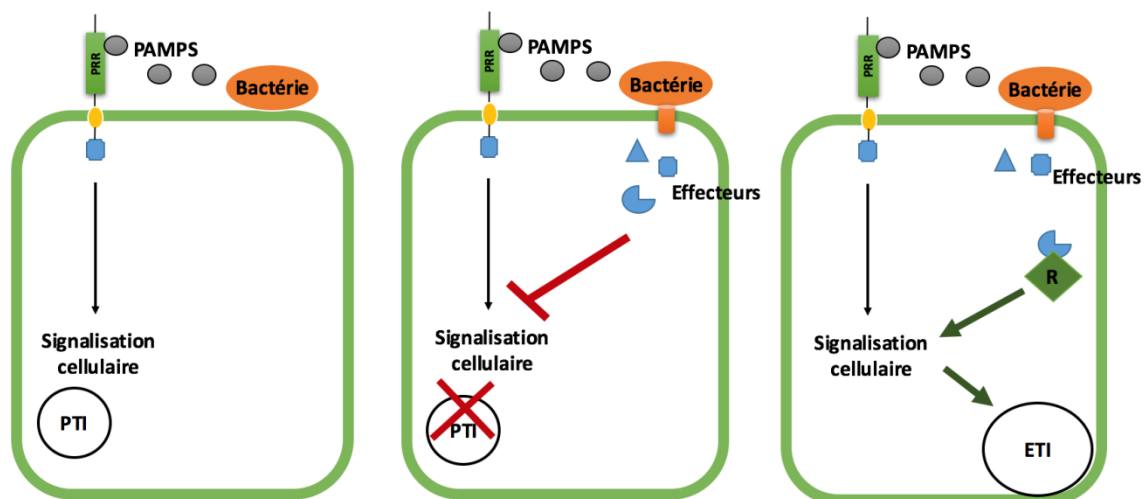


Figure 2. Inhibition de la voie PTI par les effecteurs et activation de la voie ETI.

Modèle inspiré des auteurs (Zamioudis et Pieterse, 2012).

L'activation de la voie PTI est inhibée par la présence d'effecteurs issus de la bactérie. Ces protéines effectrices sont reconnues par les gènes de résistance (R) qui activent la voie ETI ayant une amplitude de réponse plus spécifique et plus importante que celle de la voie PTI.

1.1.3.2.2 Les protéines (R) et la reconnaissance R-Avr

Les protéines (R) sont des récepteurs en général intracellulaires (Jones et Dangl, 2006). Ces protéines appelées NB-LRR sont composées de deux domaines protéiques conservés : le domaine NB (Liaison nucléotides) et le domaine LRR (répétition riche en leucines) (Dodds et Rathjen, 2010). Concernant le domaine LRR, celui-ci est un domaine carboxy-terminal impliqué principalement dans la reconnaissance de l'agresseur. Le domaine NB quant à lui, est un domaine central liant l'ATP (adénosine triphosphate) ou l'ADP (acide désoxyribonucléique) et qui est impliqué dans la transduction du signal de perception après reconnaissance. Il existe également un domaine N-terminal qui peut être divisé en deux familles : celle avec un domaine TIR (*Récepteur Toll interleukine*) et celle avec un domaine CC (*coiled-coil*). Ainsi, ces domaines jouent un rôle important dans la détection et la signalisation (Qi et Innes, 2013 ; Swiderski *et al.*, 2009). Par ailleurs, la reconnaissance des effecteurs par les protéines (R) se fait en général d'une façon indirecte (Crabill *et al.*, 2010). Cependant, il existe des exceptions où l'effecteur interagit directement avec la protéine (R) pour induire la voie ETI. À titre d'exemple, l'effecteur AvrRps4 (effecteur de *Pseudomonas syringae*) de *P. syringae* interagit spécifiquement avec la protéine de résistance RPS4 (*Resistance to Pseudomonas Syringae4*) provoquant l'activation de la voie ETI (Khan *et al.*, 2016). En ce qui concerne la reconnaissance indirecte, elle implique une protéine dite de garde et liée à la protéine (R). Ainsi, cette protéine (R) détecte les modifications causées par ces effecteurs sur les protéines de garde, ce qui par conséquent active la réponse ETI (Figure3). L'effecteur AvrPphB cible la Kinase PBS1 et bloque directement la signalisation immunitaire de FLS2 (Zhang *et al.*, 2010). Cette kinase est sous le contrôle de la protéine de résistance RPS5 (*Resistance to Pseudomonas Syringae5*) qui est donc activée suite à ce clivage (DeYoung *et al.*, 2012). En effet, l'augmentation et la répression dans l'accumulation de la protéine de résistance RPS5 peuvent dépendre de plusieurs facteurs. Cette protéine de résistance peut-être aidée dans sa localisation et dans son accumulation par le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF4) lors d'une infection par un agent pathogène exprimant l'effecteur AvrPphB (Tian *et al.*, 2009).

Récemment, un nouvel outil a été amélioré permettant de substituer la séquence de clivage de AvrPphB dans PBS1 par d'autres protéases sécrétées par un pathogène. Il existe aussi certains pathogènes qui peuvent modifier spécifiquement la séquence de clivage de l'effecteur protéine protégée par RPS5 par une protéine de garde et ainsi l'inhiber (Sun *et al.*, 2017). De plus, on retrouve également dans la reconnaissance indirecte, l'effecteur bactérien AvrRpm1 (*Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*) qui phosphoryle la protéine RIN4 (*RPM1 INTERACTING4*) (Figure 3). Cette protéine sert d'échafaudage et est impliquée dans la voie de PTI. Cette phosphorylation provoque un changement de conformation et active la protéine de résistance RPM1 (*Resistance to Pseudomonas Maculicola1*) menant enfin à l'induction de la voie ETI (Jones et Dangl, 2006).

Les deux types de résistance induite (PTI, ETI) retrouvés chez les plantes sont locaux, mais peuvent néanmoins être suivis d'une résistance systémique acquise permettant à la plante entière de se protéger contre les agents pathogènes (Qi et Innes, 2013 ; Figure 7).

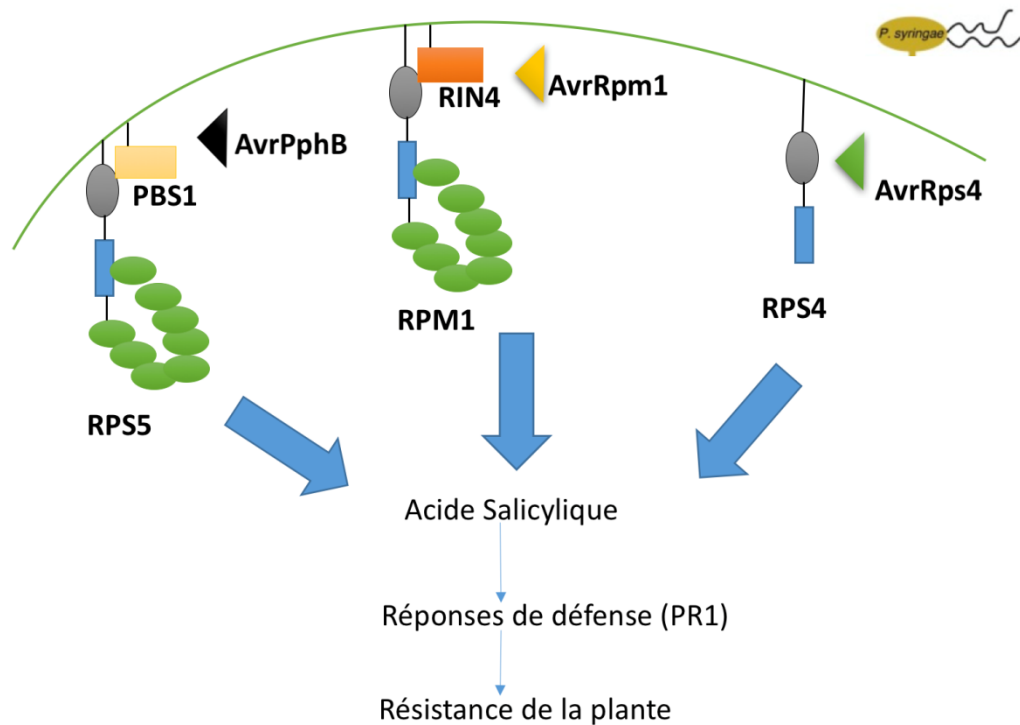


Figure 3. Activation de la voie ETI avec des protéines de résistance et des effecteurs différents.

Modèle inspiré des auteurs Qi et Innes, 2013.

Les protéines de garde PBS1 et RIN4 sont les cibles des effecteurs de *P.syringae* AvrPphB. Une modification de ces derniers active les protéines de résistance RPS5 et RPM1. Pour la protéine de résistance RPS4, elle est activée directement par la présence de l'effecteur bactérien AvrRps4. L'activation des différentes protéines de résistance active la même voie de l'AS. Cette hormone joue un rôle dans l'accumulation de la protéine de défense PR1 qui permet à la plante de résister à la bactérie.

RPS5 et RPM1 :  domaine CC ;  domaine NBS ;  domaine LRR

RPS4 :  domaine TIR ;  domaine NBS

1 .1.4 Les réponses de défenses induites chez les plantes

L'une des premières réponses de défense lors d'une résistance induite est la RH (réaction d'hypersensibilité) (Bonas et Lahaye, 2002). Outre la RH, il est possible de noter l'activation d'autres gènes de défense dans le noyau qui renvoie à diverses réponses de défense locale comme l'accumulation de protéines PR (reliées à la pathogenèse) et des métabolites secondaires (les hormones de défense).

1 .1.4.1 Réaction hypersensible

Il s'agit d'une mort cellulaire rapide comme décrite pour la première fois par Stakman (1915) lorsqu'il étudiait l'infection des plantes de blé par des champignons. La réaction d'hypersensibilité est donc considérée comme une première réponse favorisant la résistance de la plante (Bonas et Lahaye, 2002). En effet cette réponse de défense peut être activée par la présence d'une forte accumulation de ROS (espèces activées de l'oxygène) et de NO (oxyde nitrique) (Bienert *et al.*, 2006). Ces éléments jouent un rôle dans des métabolismes respiratoires et photosynthétiques. Ils interviennent également dans la mise en place des mécanismes de défense lors d'un stress chez la plante (Dat *et al.*, 2000; Van Breusegem et Dat, 2006). En outre, ces composés agissent dans la signalisation cellulaire pour permettre la formation d'une réponse de défense localisée autour du site d'infection (Nurnberger *et al.* 2004) (Figure 4). La réponse d'hypersensibilité est donc une PCD (mort cellulaire programmée) qui limite la dissémination d'agents phytopathogènes avirulents biotrophes et hémibiotrophes (Figure 4). Cependant, ce type de réponse peut contribuer au développement des agents pathogènes nécrotrophes tels que *B. cinerea* et est dans ce cas, un indicateur de la réussite de l'infection. Le plus souvent, la PCD active les parties distales non infectées de la

plante (Nurnberger *et al.* 2004). Cela prémunit enfin la plante contre une autre infection par divers agents pathogènes, tels que : les virus, les bactéries et les champignons.

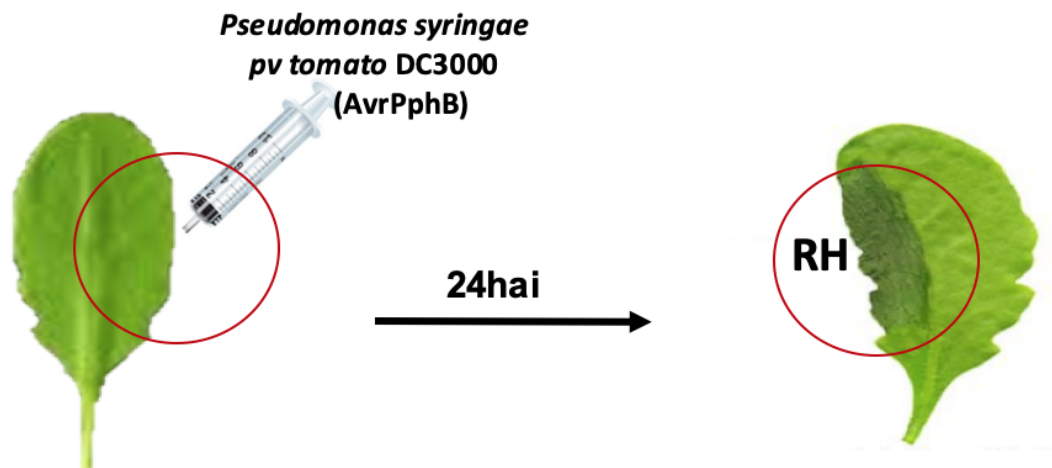


Figure 4. Réponse d'hypersensibilité contre une souche bactérienne avirulente chez *Arabidopsis*.

La feuille d'*Arabidopsis* est infectée avec la souche avirulente de *P. syringae pv tomato* DC3000 exprimant l'effecteur AvrPphB. 24h après infection (24hai) une réponse d'hypersensibilité se traduit par une mort cellulaire locale afin de limiter la croissance bactérienne.

1.1.4.2 Protéines PR et la famille de protéines PR-1

Les protéines PR constituent un groupe de protéines jouant un rôle principal dans la défense lors des attaques d'agent pathogène avec une activité antimicrobienne et antifongique. Elles jouent également un rôle dans le développement et le renforcement de la paroi cellulaire chez les plantes (Karppinen *et al.*, 2016). Elles sont retrouvées dans de nombreuses espèces

végétales et sont regroupées en 17 familles différentes selon leur homologie de séquence et leurs activités biologiques (Van loon *et al.*, 2006). Le groupe le plus abondant de protéines PR est le groupe PR1 appartenant à une super famille de protéines riches en cystéines. Ce groupe représente 1% à 2% des protéines totales de la feuille avec un poids moléculaire de 14 à 17 kDa. En raison de cette petite taille, sa véritable fonction reste encore inconnue car les protéines PR agissent souvent ensemble et sont souvent codées par plusieurs gènes. En plus, leur taille rend les tests sur leur contribution génétique dans la défense des plantes difficiles (Fu et Dong, 2013). Néanmoins, les protéines PR1 sont souvent utilisées comme marqueur contre les défenses des agents pathogènes chez les plantes à cause de leur forte accumulation. Les PR1 sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et sont localisées dans les vacuoles ou au niveau de l'apoplaste où se trouvent les agents pathogènes bactériens (Dong, 2004 ; Edreva, 2005). Leur synthèse est activée par des facteurs de transcription à savoir les protéines NPR1 (*Non-expressor of Pathogenesis-Related genes1*) et les protéines TGA (*TGACG-BINDING FACTORS*) (Figure 5). En ce qui concerne les protéines NPR1, elles sont localisées au niveau du cytosol sous forme d'oligomères inactives. Une fois que la cellule est infectée par un agent pathogène, la plante accumule plus d'AS favorisant, entre autres, un changement Redox. Cette réduction du milieu permet au complexe d'oligomère de NPR1 de générer des monomères qui migrent au noyau afin d'interagir avec les facteurs de transcriptions TGA, activant ainsi l'expression du gène qui code pour la protéine PR1 (Figure 5) (Pieterse et Van Loon, 2004). La présence de protéine PR1 favorise une résistance locale au site de l'infection, mais aussi joue un rôle dans la SAR (Résistance systémique acquise) (Uknes *et al.*, 1992).

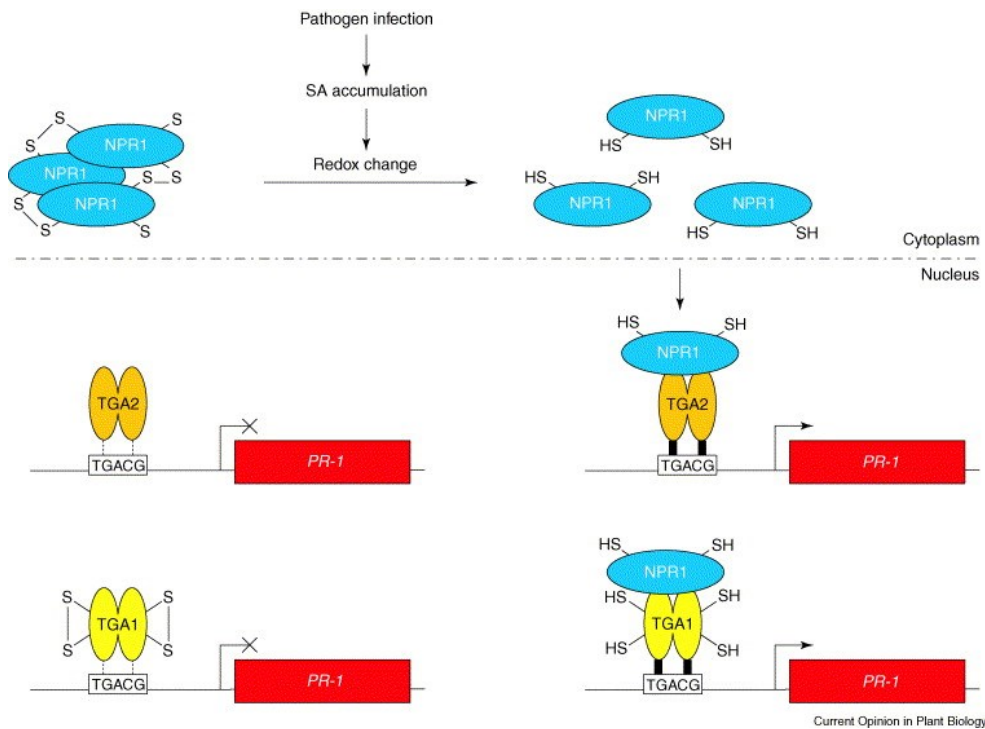


Figure 5. Expression du gène codant pour la protéine PR1 médiée par les protéines NPR1, TGA1 et TGA2 (Pieterse et Van Loon, 2004)

Les protéines NPR1 subissent un changement redox et une rupture des ponts disulfures dans le cytoplasme par l'accumulation d'AS dû à la présence d'un agent pathogène. Les molécules monomériques de NPR1 migrent vers le noyau pour permettre l'activation de la transcription du gène PR1. En effet, les protéines NPR1 en se liant aux facteurs de transcriptions TGA1 et TGA2 vont former un complexe qui se lie aux séquences TGACG se trouvant dans la région promotrice du gène PR1 et l'active permettant la défense de la plante.

1.1.4.3 Les hormones de défense chez les plantes

Ces phytohormones sont des métabolites et des messagers secondaires ayant un rôle dans l'activation de certains facteurs de transcription comme la famille des TGA et les WRKY

(Zhou *et al.*, 2000). Ces facteurs se rendent au noyau et permettent l'expression des gènes de défense nécessaires pour limiter ou éliminer les agents pathogènes. L'AS, l'AJ et l'Éthylène (ET) sont trois hormones jouant un rôle majeur dans la mise en place des réponses de défense chez les plantes (Johansson *et al.*; 2006). L'expression de ces phytohormones dépend du type d'agents pathogènes qui infecte la plante (nécrotrophe, biotrophe ou hémibiotrophe). Elles jouent non seulement un rôle dans la LAR (résistance acquise locale), mais aussi dans la SAR.

1.1.4.3.1 L'acide salicylique

Cette hormone est un signal intracellulaire responsable de la mise en place d'une partie des réponses requises pour contrer les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes lors des réponses immunes, incluant la voie ETI (Glazbrook, 2005). L'AS est notamment requis pour l'expression de certaines protéines PR (Ryals *et al.*, 1996). Sa synthèse est premièrement possible grâce à la conversion de l'acide shikimique provenant de la glycolyse et de la voie du pentose phosphate en acide chorismique. Pour convertir cet acide en AS, on distingue deux voies : la voie enzymatique PAL (phenylalanine ammonia lyase) et la voie enzymatique ICS (isochorismate synthase) (Figure 6). Il existe chez *Arabidopsis* quatre isoformes de PAL et deux ICS, dont ICS1, le principal contributeur de la voie de synthèse de l'AS.

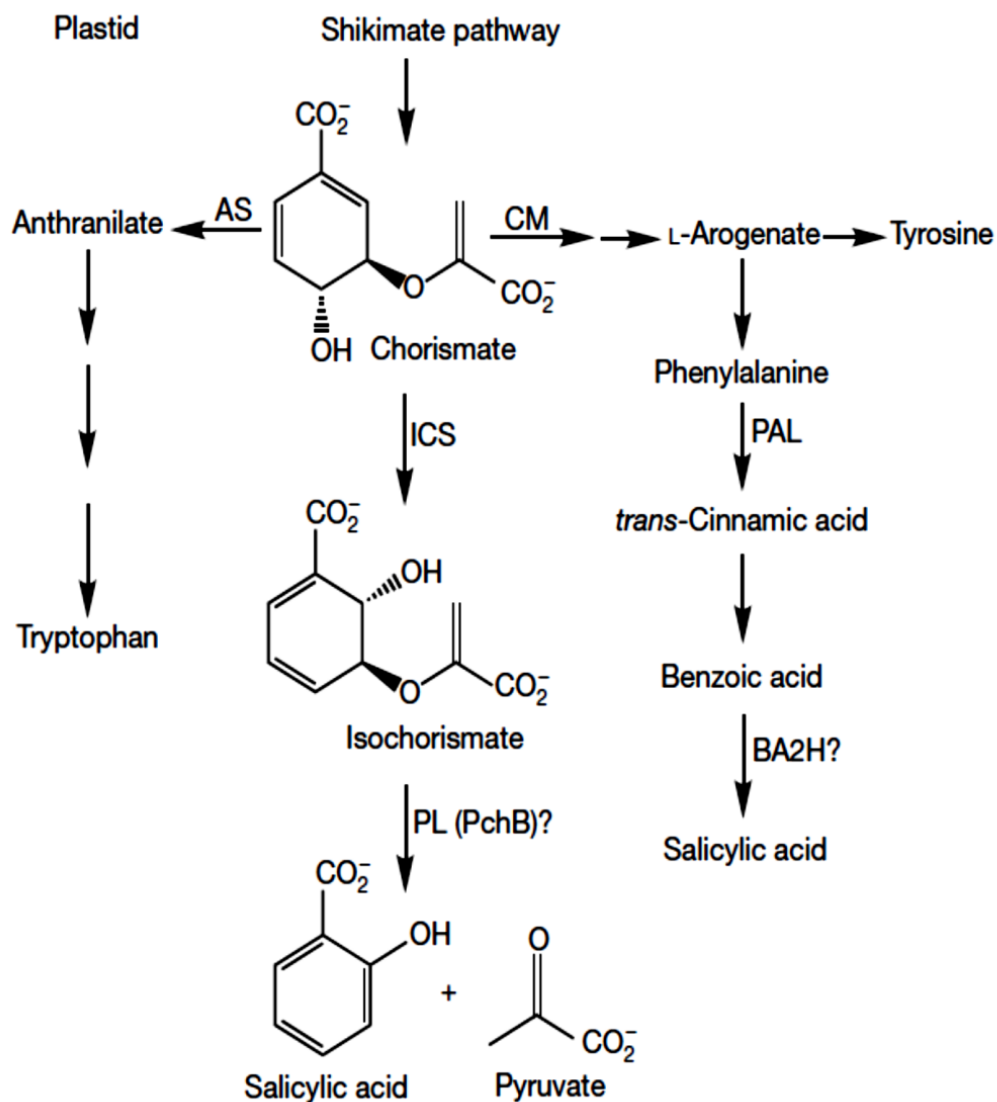


Figure 6. Différentes voies de synthèse de l'AS (Wildermuth *et al.*, 2001)

AS= anthranilate synthase ; BA2H= benzoic acid-2 hydroxylase ; CM= chorismate mutase ; ICS= isochorismate synthase ; PAL= phenylalanine ammonia lyase ; PL= pyruvate lyase

Vu le rôle important de l'AS dans la défense des plantes, il est donc contrôlé au niveau de sa biosynthèse, de son accumulation et de sa signalisation. En effet, après la biosynthèse de l'AS, à partir de la voie principale qui est celle de ICS1, une partie est emmagasinée sous forme inactive appelée SAG (*salicylique acid glucoside*). Cette forme conjuguée est convertie au

besoin en forme active par hydrolyse. Il existe des protéines régulatrices positives et négatives de l'accumulation de l'AS. Parmi les régulateurs positifs, on peut citer la lipase EDS1 (*enhanced disease susceptibility*) et la protéine PAD4 (*Phytoalexin deficient 4*). En effet, la protéine EDS1 joue aussi un rôle dans la mise en place de la RH et dans l'initiation de la résistance. En revanche, PAD4 renforce les réponses médiées par EDS1 (Feys *et al.*, 2001). Les deux protéines PAD4 et EDS1 sont capables d'interagir entre elles et cette interaction est importante pour leur fonctionnement. L'AS favorise aussi un changement de conformation du co-activateur NPR1 sous forme d'oligomères en monomère. La forme monomère migre par la suite vers le noyau et interagit avec des facteurs de transcription TGA pour induire l'expression de la PR1, comme décrite ci-dessus (Fu et Dong, 2013) (Figure 5)

1.1.4.3.2 Les jasmonates et l'éthylène

Les jasmonates sont produits à partir de la voie d'un acide gras qui est l'acide linoléique et sous l'action des LOX (lipoxygénases) (La camera *et al.*, 2004). Cette hormone joue un rôle important dans la résistance contre les agents nécrotrophes. L'AJ est impliqué dans l'induction des protéines de défense comme les défensines, les osmotines, les thionines de même que les inhibiteurs de protéases. L'ET est aussi une phytohormone jouant un rôle dans l'activation des réponses de défense lors d'une présence d'agents biotiques ou abiotiques (Durrant et Dong, 2004).

1.1.5 Mobilité du signal de la SAR et résistance systémique induite

À partir de la résistance locale, les acteurs de la SAR envoient des signaux pour prévenir toutes les parties de la plante afin qu'elles se préparent à résister à des attaques ultérieures

(Figure 7). Ainsi ces parties présentant ce signal deviennent automatiquement résistantes à un large spectre d'agents pathogènes (Durrant et Dong, 2004). Durant la réponse SAR, on assiste à une accumulation locale et systémique d'AS endogène, mais aussi de la protéine PR1. Cette observation a de ce fait permis d'identifier ces protéines comme étant des marqueurs de cette réponse. Par ailleurs, certaines molécules se liant à l'AS ont été identifiées comme des messagers diffusables de la SAR. Un exemple est la MeSA (méthyl salicylate) qui se transmet par l'air ou au sein de la plante par le phloème. Cependant, chez certaines plantes mutantes, une réponse SAR est notée malgré une déficience en AS et en MeSA (Attaran *et al.*, 2009). Ainsi les chercheurs ont pu identifier le benzo-(1, 2,3) -thiadiazol-7-carbothiate de S-méthyl (BTH) et l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) comme étant des analogues fonctionnels de l'AS. En effet, ces molécules sont connues pour activer des gènes de défense comme les gènes PR (Ryals *et al.*, 1996; Uknes *et al.*, 1992). L'acide azélaïque est aussi reconnu comme un messenger activant la SAR (Fu et Dong, 2013). Le principal intérêt de cette résistance acquise est de réduire les dépenses énergétiques de la plante et d'amplifier les réactions de défense lors d'une infection secondaire. C'est ce qu'on appelle la potentialisation. Un autre type de résistance acquise est celle de l'ISR (résistance systémique induite). De même que la SAR, l'ISR confère aussi une résistance contre un large spectre d'agents pathogènes induisant l'expression des mécanismes de défense des plantes. Des études ont montré que c'est une voie dépendante des voies de l'AJ et de l'ET (Pieterse *et al.*, 1998), mais que toutefois elle peut aussi être dépendante de la voie de l'AS (David *et al.*, 2019).

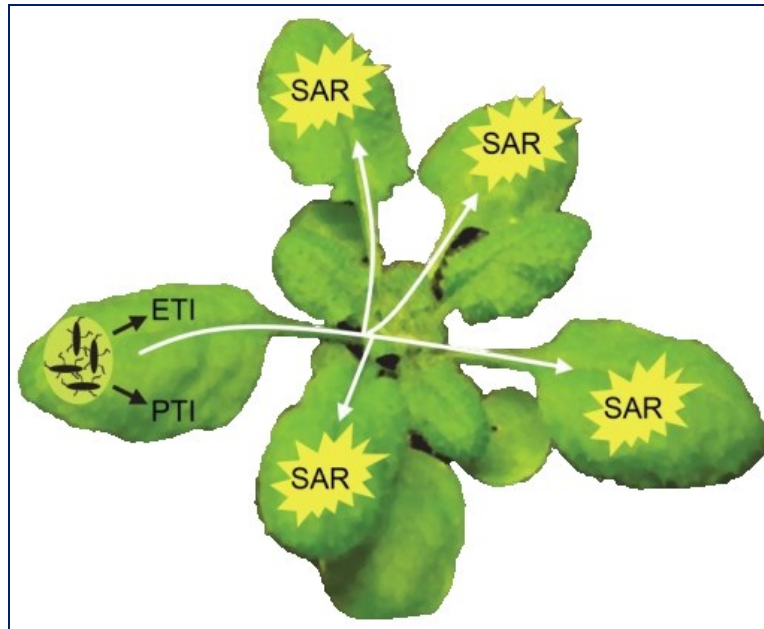


Figure 7. Résistance systémique acquise après infection par des agents pathogènes et activation des voies PTI et ETI (Shah et Zeier, 2013)

1.2 L'ARN interférence ou ARNi

L'ARNi (ARN d'interférence) est une voie de régulation retrouvée dans les cellules eucaryotes pour combattre les agents pathogènes, mais aussi pour contrôler l'expression des gènes endogènes. Cette voie est activée par la présence d'ARNdb (ARN double brin) considérée comme aberrante chez la cellule.

1.2.1 Principe général de l'ARNi

Il s'agit d'un processus qui met en jeu des petits ARN (acide ribonucléique) de 20-25 nucléotides. Ces petits ARN agissent en tant que ribo-régulateurs négatifs sur d'autres acides nucléiques qui leur sont complémentaires ou partiellement complémentaires (ADN et ARN) (Carthew et Sontheimer, 2009). Ils sont produits par un ou plusieurs paralogues de la RNase III Dicer (DCL) et sont ensuite incorporés dans un complexe multiprotéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Figure 8). Ce complexe comprend les endonucleases AGO (*argonaute*) utilisant un des brins des petits ARN pour cibler des ARNsb (ARN simples-brins) complémentaires. Cette liaison des AGO aux ARN simples cibles entraîne donc leur clivage et/ou la répression de leur traduction (Carthew et Sontheimer, 2009). Lorsqu'il s'agit d'un clivage de l'ARN par le complexe RISC, la plante peut amplifier le phénomène d'ARNi en générant des ARNse (ARN secondaire). En effet, la RDR (ARN polymérase dépendante de l'ARN) va utiliser le petit brin qui n'était pas pris en charge par AGO comme amorce et les transcrits cibles comme matrice pour générer des ARNdb (ARN double brin) (Cuperus *et al.*, 2010) (Figure 10). Chez *Arabidopsis* les ARNdb générés sont pris en charge par DCL2 et DCL4 pour engendrer d'autre ARNse (Kim *et al.*, 2014). De plus, la plupart des petits ARNse étant mobiles, ceux-ci peuvent devenir systémiques et agir sur les transcrits à distance (Kim *et al.*, 2014). Chez la plante modèle *Arabidopsis*, on retrouve quatre DCL, dix AGO et six RDR. L'ARNi a plusieurs voies, dont deux principalement relatées dans plusieurs revues à savoir la voie des petits ARN d'interférence (voie antivirale) et la voie des miARN (microARN).

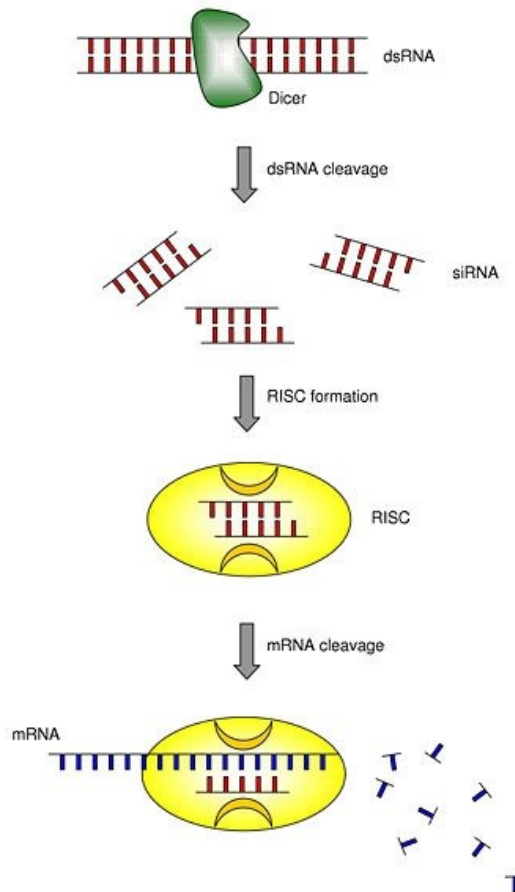


Figure 8. Mécanisme général de l'ARNi (Raynal, 2011)

La présence d'ARNdb est reconnue par DCL qui le clive en petit ARNdb. Le petit ARNdb est ensuite incorporé dans le complexe nucléoprotéique RISC. Ce dernier utilise un des brins du petit ARNdb et va cliver des séquences d'ARNm (ARN messenger) ayant une homologie parfaite.

1 .2.2 La voie antivirale de l'ARNi

Les plantes peuvent être infectées par les virus à ADN et les virus à ARN aussi bien simple que double brin. Pour se défendre contre l'infection de ces virus, les plantes utilisent le

mécanisme de l'ARNi. En ce qui concerne les virus à ARN, la plupart pouvant infecter les plantes sont ceux ARNsb (+) (Roossinck, 2013; Waterhouse *et al.*, 2001). Ces virus à ARNsb, sont traités chez la plante par la RDRv (*Viral RNA Dependent RNA Polymerase*) afin de convertir l'ARNsb du virus en ARNdb (Qu et Morris, 2005). Cet ARNdb pathologique pour la plante est digéré par DCL en petits ARNi. À ce stade, les ARNi issus de l'ARN viral sont reconnus par la polymérase RDR de la plante formant des ARNdb (Burguán et Havelda, 2011). Ceux-ci sont reconnus par DCL formant d'autres petits ARN secondaires (Figure 9) et assemblés en simple brin dans le complexe RISC pour aller cibler et cliver les ARN simples brins viraux qui leur sont homologues (Lakatos *et al.*, 2004) (Figure 9). Concernant les virus à ADN, il existe quatre groupes pouvant infecter les plantes. Ceux sont : les caulimovirus et les badnavirus qui ont un ADN double brin, les géminivirus et les nanovirus qui ont un ADN simple brin circulaire (Fauquet *et al.*, 2005). Ces virus à ADN se répliquent dans le noyau des cellules qu'ils infectent (Wanitchakorn *et al.*, 1997) afin d'y être transcrits. Une fois transcrits, ils peuvent être pris en charge par la RDR pour produire un ARNdb qui les reconnaît par des éléments structuraux spécifiques ayant des caractéristiques moins connues. Suite à cette étape, les événements qui suivent sont similaires comme pour les virus à ARN (Becker et Lange, 2010)

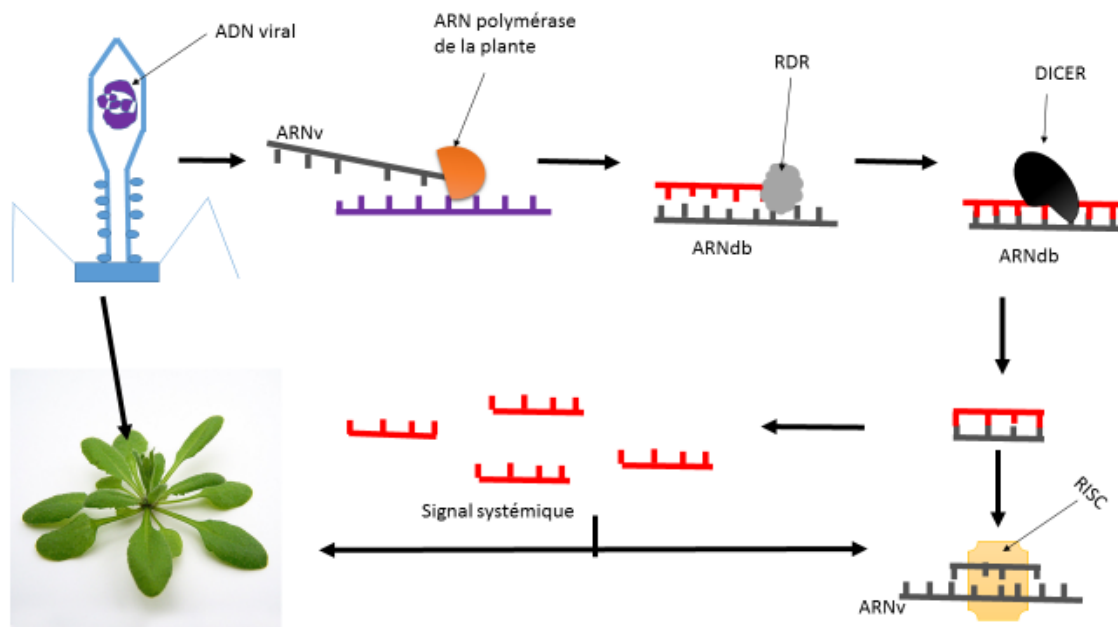


Figure 9. Infection de la plante par un virus à ADN simple brin suivi d'une immunité locale et systémique acquise par la plante.

L'ADN viral est transcrit dans le noyau à partir de l'ARN polymérase de la plante en ARNv (ARN viral). Cet ARN est ensuite transformé en ARNdb grâce à la RDR que reconnaît et clive l'enzyme DICER. Un des petits brins d'ARNdb est incorporé dans le complexe RISC pour aller cliver les autres brins ARNv. L'autre brin du petit ARNdb va permettre une amplification et transmettre un signal systémique dans les parties distales de la plante.

1.2.3 Voie des miARN

Les miARN sont de petits ARN non codants responsables du contrôle de l'expression des gènes par clivage direct des ARN cibles et/ou par répression de leur traduction (Borges et Martienssen, 2015). Ceci a ainsi pour objectif de réguler divers processus biologiques incluant l'immunité de la plante (Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007). Ces miARN sont codés à partir

des gènes MIR non codants par l'ARN Pol II (Kim *et al.*, 2014). La transcription de ces gènes MIR génère en premier lieu le pri-miARN (miARN primaire) qui sera clivé une première fois par l'endonucléase DCL1 afin de lui ôter sa queue PolyA produisant ainsi le précurseur de miARN. Ce précurseur subira à son tour un clivage par DCL1 afin de se débarrasser de la tige en boucle générant des duplex de fragments d'ARN de 21 et de 22nt (Chen, 2005). Ces duplex sont par la suite exportés dans le cytoplasme où ils subissent des modifications biochimiques. L'exportation du noyau au cytosol se fait par HST (*HASTY*), une protéine homologue au transporteur Exportin-5 chez les animaux. En outre, l'accumulation et la maturation des petits ARN nécessitent une méthylation (2'- *O*-méthyle) à l'extrémité 3' par la méthyl-transférase HEN1 (*HUA enhancer 1*) (Tiwari *et al.*, 2014). Le miARN mature (dans le duplex miARN / miARN *) est ensuite pris en charge par le complexe RISC contenant AGO (Figure 10) afin d'aller chercher une complémentarité avec les ARNm. Lorsque l'homologie est parfaite le brin est clivé par le domaine PAZ (*PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE*) d'AGO. Dans le cas contraire, la traduction est inhibée (Chen, 2005; Sanei et Chen, 2015).

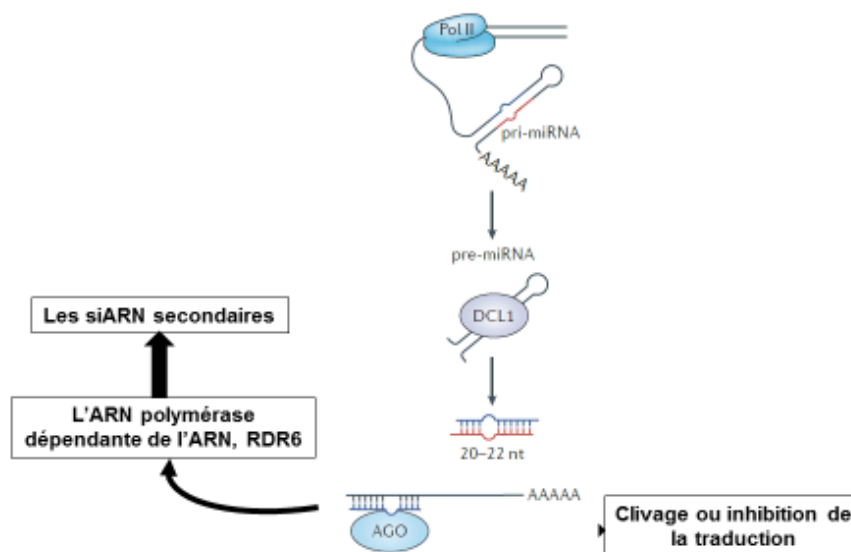


Figure 10. Voie de synthèse des miARN (Borges et Martienssen, 2015)

Les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II pour donner le pri-miRNA qui par la suite génère le pre-miRNA transformé en duplex de petit brin de 20-22nt par clivage de l'enzyme DICER. En présence de AGO, un des brins du duplex va cliver ou inhiber des transcrits tandis que l'autre brin va générer des ARNse avec la RDR6.

1.2.3.1 Rôles des miARN chez les plantes

Les miARN qu'on retrouve dans la cellule végétale sont très diversifiés et jouent chacun un rôle très spécifique. Ils sont considérés comme des molécules régulatrices de gène endogène à chaque étape de développement de la plante. Cette régulation des gènes est si importante et tellement conservée chez les plantes que les chercheurs ont développé une technique analogue à celle des miARN (Alvarez *et al.*, 2006 ; Schwab *et al.*, 2006). En effet, cette technologie

consiste à générer des séquences artificielles de miARN dans le duplex de miARN / miARN *. Ceci permettant ainsi de cibler spécifiquement un ou plusieurs ARNm (Schwab *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2014)

1.2.3.1.1 Rôles des miARN dans la croissance et le développement des plantes

Il existe un grand nombre de miARN jouant un rôle de régulateurs post-transcriptionnels dans le développement des feuilles, des racines et dans le processus de développement des plantes (Nadiya *et al.*, 2019). En effet, chez des plantes telles qu'*Arabidopsis*, des études ont montré que le changement de phase végétative est contrôlé par les activités de miR156 et miR172 (Wu *et al.*, 2009). Au début de la phase de développement de la plante, les niveaux de miR156 sont fortement exprimés et diminuent avec le temps, tandis que la tendance inverse s'observe pour miR172 (Aukerman et Sakai, 2003; Lauter *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Il a également été démontré que mir165/166 et mir160 sont deux régulateurs importants du développement des feuilles (Yan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Des découvertes récentes ont montré que, mis à part un certain nombre de gènes codant pour des protéines, plusieurs miARN seraient impliqués dans les processus de développement des racines. Ce qui renforce l'idée que les miARN jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biochimiques et biophysiques des plantes. En ce qui a trait au développement des racines, il n'a pas été démontré que des miARN régulent leur développement. Cependant, ils ont été identifiés comme jouant plusieurs rôles dans le développement de la plante. À titre d'exemple, la famille mir160 a d'abord été signalée comme étant importante pour la formation de la coiffe racinaire chez *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2005). Par la suite, il a été démontré que ce microARN joue un rôle clé de la formation des cellules de la coiffe racinaire (Gutierrez *et al.*, 2009). En effet, le développement des racines est un processus complexe qui implique l'intégration d'hormones végétales, de régulateurs de la transcription et de petits ARN afin d'assurer un meilleur développement pour la plante (Meng *et al.*, 2010). En outre, le miR164 est signalé essentiel au

développement des feuilles et des organes racinaires latéraux. Le rôle de miR167 est bien documenté dans les processus d'organes de reproduction. Il contrôle la fertilité de l'ovule et de l'anthere en façonnant le schéma spatio-temporel des gènes cibles.

1.2.3.1.2 Rôles des miARN dans l'immunité des plantes.

Les plantes possèdent des récepteurs immunitaires sophistiqués leur permettant de se défendre contre les agents pathogènes. En effet, l'inhibition génique médiée par un miARN végétal dans la réponse de défense peut se produire par une répression concomitante des régulateurs de la réponse immunitaire positive et négative. Elle peut également mener à l'activation d'un régulateur immunitaire positif et négatif responsable de la défense. Ainsi, les répétitions riches en leucine se liant aux nucléotides (NB-LRR) et reconnaissant spécifiquement les effecteurs sont les cibles fréquentes des miARN des plantes (Cui *et al.*, 2017). En exemple, le gène N de résistance au virus de la mosaïque du tabac (TMV) est régulé par le miARN 6019/6020 (Li *et al.*, 2012). Le miR393 quant à lui, est le premier à être identifié chez les plantes comme jouant un rôle dans la défense antibactérienne (Navarro *et al.*, 2006). Il serait impliqué dans la régulation négative des gènes de signalisation de l'auxine en altérant ces récepteurs, mais aussi, dans la voie de PTI (Jin, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2009). En outre, miR160 a été identifié comme un régulateur positif, tandis que miR825 est l'un des régulateurs d'immunité négative identifiés dans la défense contre l'infection bactérienne (Li *et al.*, 2010). Dans les infections fongiques par exemple, des études ont révélé que les miARN modulent les réponses de la maladie du riz par *M. oryzae* (*Magnaporthe oryzae*) en régulant des gènes cibles (Campo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Ainsi, on retrouve un grand nombre de miARN dans la cellule végétale jouant chacun un rôle très spécifique. La question à se poser est à savoir comment la plante arrive-t-elle à réguler l'accumulation de tous ces miARN ?

1.2.3.2 Régulation de l'accumulation des microARN

La régulation de l'accumulation des miARN peut se faire au niveau transcriptionnel, et plus récemment au niveau post-transcriptionnel. En effet, un groupe américain a découvert la présence des protéines appelées SDN (*Small RNA-degrading nucleases*) qui ont pour fonction de dégrader les miARN contrôlant ainsi leur homéostasie (Ramachandran et Chen, 2008)

1.2.3.2.1 Les protéines SDN

Les protéines SDN sont de petites protéines avec une activité 3'-5'exoribonuclease. Il existe trois gènes à savoir SDN1, SDN2, et SDN3 qui ont été étudiés par l'équipe de Ramachandran et Chen (2008). Les analyses de ces chercheurs ont permis de conclure que ces protéines dégradent des miARN. En effet, ils ont pu démontrer que SDN1 a une activité exoribonuclease et qu'elle se lie aux oligonucléotides simple brin. Ainsi, cette protéine se lie et dégrade plus rapidement le miARN non méthylé que le méthylé. En revanche, lorsque les miARN ne sont pas méthylés par HEN1, ils peuvent être uridylés. En effet, cette uridylation est possible par l'enzyme HESO1 (*HEN1 SUPPRESSOR1*) en 3'. Il existe aussi un autre nucléotidyl transférase appelé URT1 (ARN uridylyltransférase 1) capable d'uridyler des brins de miARN. Ainsi donc, lorsque les miARN ne sont pas méthylés et que AGO1 se lie à ceux-ci, il peut recruter HESO1 ou URT1 (Borges et Martienssen, 2015; Chen *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017). Lorsqu'il s'agit de HESO1, le miARN subit une polyuridylation. Tandis que la présence de URT1 mono-uridyle le miARN. Cette différence d'uridylation entre HESO et URT1

s'explique par les différences de substrat dépendamment du nucléotide présent dans la partie 3' du miARN. En effet, URT1 se lie préférentiellement aux extrémités 3' Adénylés et HESO1 aux extrémités 3'Uridylés (Borges et Martienssen, 2015) . Il est ainsi soupçonné que AGO1 jouerait plusieurs rôles à savoir dans l'interaction et le recrutement d'enzymes SDN1, HESO1 et URT1 pour la dégradation des miARN.

Il a aussi été noté une activité de SDN1 sur des miARN méthylés où cette dernière inhiberait par exemple le miR173 (Ramachandran et Chen, 2008). Ce qui laisse à penser que SDN1 serait donc impliqué de la dégradation des miARN méthylés ou uridylys (Chen *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2019). Néanmoins, aucune dégradation de SDN1 in vitro sur les miARN uridylys n'a encore été observée. La nucléase responsable de cette dégradation reste encore à être identifiée (Wang *et al.*, 2019).

Ainsi, la dégradation des miARN par les protéines SDN s'effectue sur des miARN simple brin de 17 à 27nt en général non méthylés par HEN1 (Rogers et Chen, 2013 ; Figure 11). Cette méthylation inhibe l'uridylation et la dégradation chez d'autres classes de petits ARN, comme les piARN d'animaux et les ARNse de plantes. En outre, il existe des homologues de protéines SDN chez les animaux considérés comme des protéines de type Eri-1 (*Enhanced RNAi-1*) qui dégradent des duplex d'ARNse. La même équipe de Ramachandran et Chen (2008) ont aussi noté une absence de clivage sur les pré-ARNm, les ARNr des plantes, les ARN longs, les duplex ARN double brin ainsi que petit brin miARN / miARN * de même que les ADN simple brin (Figure 11).

D'autres expériences effectuées toujours par l'équipe de Ramachandran et Chen (2008) ont montré une suraccumulation de miARN lorsqu'un seul gène est muté. Seule une double mutation des protéines SDN (*sdn1/sdn2*) montre une réduction significative dans l'accumulation de miARN. Néanmoins, seulement une proportion des miARN est affectée par

l'action des SDN. Ce qui signifie que ces SDN sont guidées dans leur clivage où il existe d'autres endonucléases impliquées dans la dégradation des miARN matures.

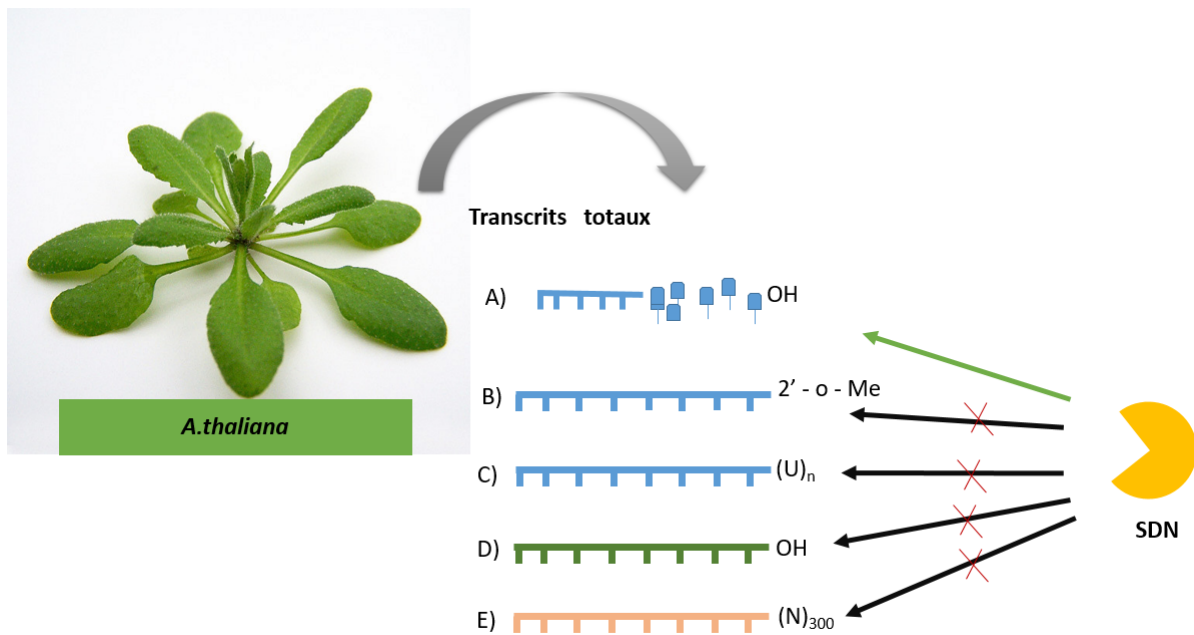


Figure 11. Action des protéines SDN sur l'ensemble de transcrits chez la plante.

Inspirée des auteurs (Rüegger et Großhans, 2012)

A) les protéines SDN dégradent le petit brin d'ARN 3'OH. B) le petit brin d'ARN avec un 2'-o-Me retarde la dégradation. C) le petit brin d'ARN oligo-urydilé inhibe le clivage. D) et E) les longs brins d'ARN et d'ADN ne sont pas clivés par les protéines SDN.

1.3 Objectifs du projet de recherche

Comme mentionné précédemment, les plantes ont développé un système immunitaire efficace appelé ETI qui se déclenche lorsqu'elles reconnaissent des effecteurs sécrétés par des agents pathogènes. En effet, les miARN sont des ribo-régulateurs qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Ils jouent également un rôle important dans la croissance, le développement et dans l'immunité de la plante. Ce contrôle est essentiel pour assurer le fonctionnement normal de la plante. L'homéostasie de ces miARN est contrôlée par des protéines SDN de manière très spécifique. Comme il existe des miARN régulateurs négatifs de l'immunité, nous croyons que le contrôle de l'homéostasie de ces miARN devrait jouer un rôle important dans la mise en place d'une immunité efficace contre les agents pathogènes. Ainsi, l'objectif principal de ma maîtrise est de tester le rôle des protéines SDN dans la régulation de l'immunité de type ETI à travers le contrôle de l'accumulation des miARN. Les objectifs spécifiques de mon projet de maîtrise consistent donc d'abord à déterminer le rôle des protéines SDN dans la mise en place de la voie ETI. Par la suite, caractériser des transcrits ou des miARN régulés lors de l'activation de la voie d'ETI et qui sont sous contrôle des protéines SDN. Finalement, déterminer le rôle de certaines cibles des protéines SDN dans la mise en place de la voie ETI.

Chapitre 2

LE ROLE DU CONTROLE DE L'HOMÉOSTASIE DES microARN DANS LA MISE EN PLACE DE LA RESISTANCE HAUTEMENT SPECIFIQUE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Présentation de l'article

Le système immunitaire des plantes a toujours été un défi pour l'homme, mais aussi pour les pathogènes qui les infectent. Ainsi, mon projet de recherche consiste à déterminer le rôle des protéines SDN dans le système de défense de la plante. En effet, ces protéines SDN responsables du contrôle de l'homéostasie des miARN ont été identifiées par l'équipe de Ramachandron et Chen (2008). Elles sont probablement activées pour favoriser une croissance optimale de la plante et améliorer sa réaction envers des stress environnementaux. Cependant l'action négative de ces miARN dans l'immunité de la plante suggère que ces protéines joueraient un rôle essentiel dans l'optimisation de ces réponses immunes. De ce fait, au sein de notre laboratoire, nous étudions le rôle de ces protéines SDN dans la voie de l'immunité induite par les effecteurs (ETI).

Dans un premier temps, nous avons sélectionné des souches bactériennes de *P. syringae* (*Pseudomonas syringae*) libérant des effecteurs qui ciblent des composantes de la défense chez la plante, ce qui y occasionne des maladies chez la plante. Ces effecteurs sont reconnus par des protéines de résistance exprimées dans notre plante modèle *Arabidopsis thaliana* et activent la voie de défense ETI. Dans un deuxième temps les éléments des marqueurs de la voie de signalisation de ETI étaient sélectionnés, à savoir l'AS et la protéine PR1. Enfin, l'action des protéines SDN en aval de la voie d'ETI a été confirmée.

Ainsi, les travaux de mon projet de recherche vous sont présentés dans ce chapitre II sous forme d'un article intitulé ''Le rôle du contrôle de l'homéostasie des microARN dans la mise en place de la résistance hautement spécifique chez *Arabidopsis thaliana*'''. Les auteurs impliqués dans la réalisation de l'article sont Marie Bernadette D.Diam et Kamal Bouarab. Les travaux de cet article combinés aux travaux de Refka Ajmi, doctorante dans le laboratoire du professeur Kamal Bouarab et travaillant sur le rôle des protéines SDN dans la voie de PTI seront soumis prochainement au journal MPMI.

Le rôle du contrôle de l'homéostasie des microARN dans la mise en place de la résistance hautement spécifique chez *Arabidopsis thaliana*.

Auteurs : Marie Bernadette D. Diam¹ et Kamal Bouarab¹

1 Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1K2R1

Résumé

Les miARN sont des petits ARN endogènes de 20-24 nucléotides (nt) qui influencent les processus de développement, de fonctionnement et de défense en régulant positivement ou négativement l'expression des gènes. Ils effectuent ce rôle grâce au complexe multiprotéique (RNA-induced silencing complex, ou RISC) contenant une endonucléase argonaute (AGO) qui les prend en charge pour cibler des ARN simples-brins complémentaires. Il est donc évident que leur accumulation chez les végétaux nécessite un contrôle strict. Chez les eucaryotes, il existe des mécanismes qui permettent de contrôler l'homéostasie des miARN. Ces mécanismes font intervenir les protéines SDN (Small RNA-Degrading nucleases) qui sont des exonucléases jouant un rôle essentiel dans ce contrôle. Mon travail montre que ces protéines SDN jouent également un rôle important dans la mise en place de la résistance hautement spécifique chez la plante.

2.1 Introduction

La plupart des agents pathogènes considèrent les plantes comme un milieu de nutrition et de reproduction. En général, pour obtenir les éléments nécessaires à leur survie, ces agents pathogènes infectieux sécrètent des effecteurs, qui sont des protéines virulentes, soit à l'intérieur ou à l'extérieur du cytoplasme végétal (Katagiri *et al.*, 2002). Ce mode de vie est en conséquence préjudicieux pour son hôte végétal. En effet, les effecteurs virulents interfèrent à plusieurs niveaux soit, au niveau de la reproduction, du développement, mais surtout, des voies de défense des plantes (Zhang *et al.*, 2010). Cependant, les plantes possèdent certaines caractéristiques leur permettant de détecter la présence par reconnaissance directe ou indirecte de leurs effecteurs. Cette reconnaissance se fait à partir de protéines de résistance sécrétées par la plante et qui sont des protéines de type NLR (Khan *et al.*, 2016). La reconnaissance par cette protéine active une voie de résistance hautement spécifique appelée ETI (Effector-Triggered Immunity) (Khan *et al.*, 2016). Cette voie est considérée par les chercheurs comme un système de résistance de type gène pour gène (Crabill *et al.*, 2010 ; Khan *et al.*, 2016). C'est-à-dire qu'il met en jeu le gène de résistance de la plante et celui de l'effecteur de l'agent pathogène. C'est ainsi qu'il a été identifié chez la plante modèle *A. thaliana* (*Arabidopsis thaliana*) plusieurs systèmes de type ETI. À titre d'exemple, les dommages causés par l'effecteur bactérien AvrRpm1 sur la protéine RIN4 (*RPM1 INTERACTING4*) sont ressentis par la protéine de résistance RPM1 (*RESISTANCE TO PSEUDOMONAS MACULICOLAI*). Ce signal perçu par RIN4 induit par la suite les réponses immunes de type ETI dans l'ensemble de la plante (Jones et Dangl, 2006). De plus, la protéine de résistance RPS5 (*RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE5*) sent les dommages causés, respectivement par l'effecteur bactérien AvrRPphB (*Pseudomonas phaseolicolaB*) de *P. syringae* (*Pseudomonas syringae*) sur PBS1 (avrPphB Susceptible 1). Ce qui active les réponses immunes et la protection de la plante contre cet agent pathogène (Jones et Dangl, 2006). En effet, la voie de défense ETI activée principalement par la présence des effecteurs est celle de l'AS (Acide salicylique). Cette phytohormone contrôle l'accumulation des gènes

PR (reliés à la pathogenèse). Il existe plusieurs groupes de gènes PR, mais le plus étudié est la protéine PR1 ayant une activité antimicrobienne.

En plus de la voie ETI, il existe aussi un autre système de défense des plantes qui est l'ARNi (ARN interférence). Ce système met en jeu des petits ARN non codants qui sont de type simple brin reconnaissant des séquences d'acides nucléiques pour inhiber ou réprimer leur expression. De nombreux gènes endogènes impliqués dans la défense comme le gène N de résistance au TMV (virus de la mosaïque du tabac) (Li *et al.*, 2012) sont régulés de cette manière via la voie des miARN (micro-ARN). Ainsi ces miARN codés à partir des gènes MIR sont aussi retrouvés chez les nématodes comme *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) et dans les cellules animales. Ils jouent non seulement un rôle dans la défense, mais aussi dans le développement des plantes. Ils doivent donc être régulés dépendamment des besoins immédiats de la plante. Ainsi donc, leur accumulation est régulée par une famille de protéines appelée SDN (*Small RNA-Degrading nucleases*) qui sont des exoribonucléases 3'-5'. Chez les plantes, on retrouve cinq superfamilles d'exoribonucléases DEDD, RRP4, PDX, RBN et RNR, (Wang *et al.*, 2018). Les SDN appartiennent à la sous-classe d'exoribonucléases DEDDh (Ramachandran et Chen, 2008) composée de 5 membres (Yu *et al.*, 2017b), dont seulement 3 ont été testées pour leur activité exonucléique (Ramachandran et Chen, 2008). Ces protéines contrôlent l'homéostasie des miARN afin d'optimiser la croissance de la plante, et de faciliter son adaptation à son environnement.

Dans la présente étude, nous avons vérifié l'implication de deux membres des protéines SDN soit SDN1 et SDN2 dans l'immunité de type ETI de la plante. Nous avons trouvé que les protéines SDN1 et SDN2 étaient requises pour l'activation de l'immunité induite par le système ETI RPS5/AvrPphB. Mes résultats apportent de nouvelles informations sur les interactions plantes-agents pathogènes et les acteurs requis pour une réponse immune optimale chez la plante modèle *A. thaliana*.

2.2 Résultats

2.2.1 Rôle des protéines SDN dans la mise en place de l'immunité induite par la voie ETI

Tout d'abord, pour déterminer si les protéines SDN sont requises pour la voie ETI, un criblage a été effectué en utilisant trois systèmes reconnus pour induire la voie ETI (RPS5/AvrPphB, RPS4/AvrRps4, RPM1/AvrRpm1) chez la plante modèle *A. thaliana*. Les feuilles des plantes sauvages (Col-0 (Columbia-0)) ainsi que celles déficientes au niveau de SDN1 et SDN2 (*sdn1/2*) ont été infiltrées par 5.10^5 CFU/ml de chacune des souches de *Pst* DC3000 (*P. syringae* pv *tomato* DC3000). Ces souches expriment séparément les effecteurs AvrPphB, AvrRps4 et AvrRpm1. Après avoir effectué un compte bactérien 4 jours après infection, les résultats ont montré (Figure 12) qu'à la différence des systèmes RPS4/AvrRps4 et RPM1/AvrRpm1, les protéines SDN1 et SDN2 sont requises pour la résistance médiée par le système RPS5/AvrPphB. Ce résultat montre l'importance du contrôle de l'homéostasie des miARN dans la mise en place de la résistance médiée par un système de type ETI. Il constitue ainsi donc une avancée majeure dans la découverte de l'impact du contrôle de l'homéostasie des miARN dans l'immunité des plantes. Cette analyse suggère aussi que les protéines SDN1 et 2 ne contrôlent pas les voies communes aux différents systèmes de type ETI.

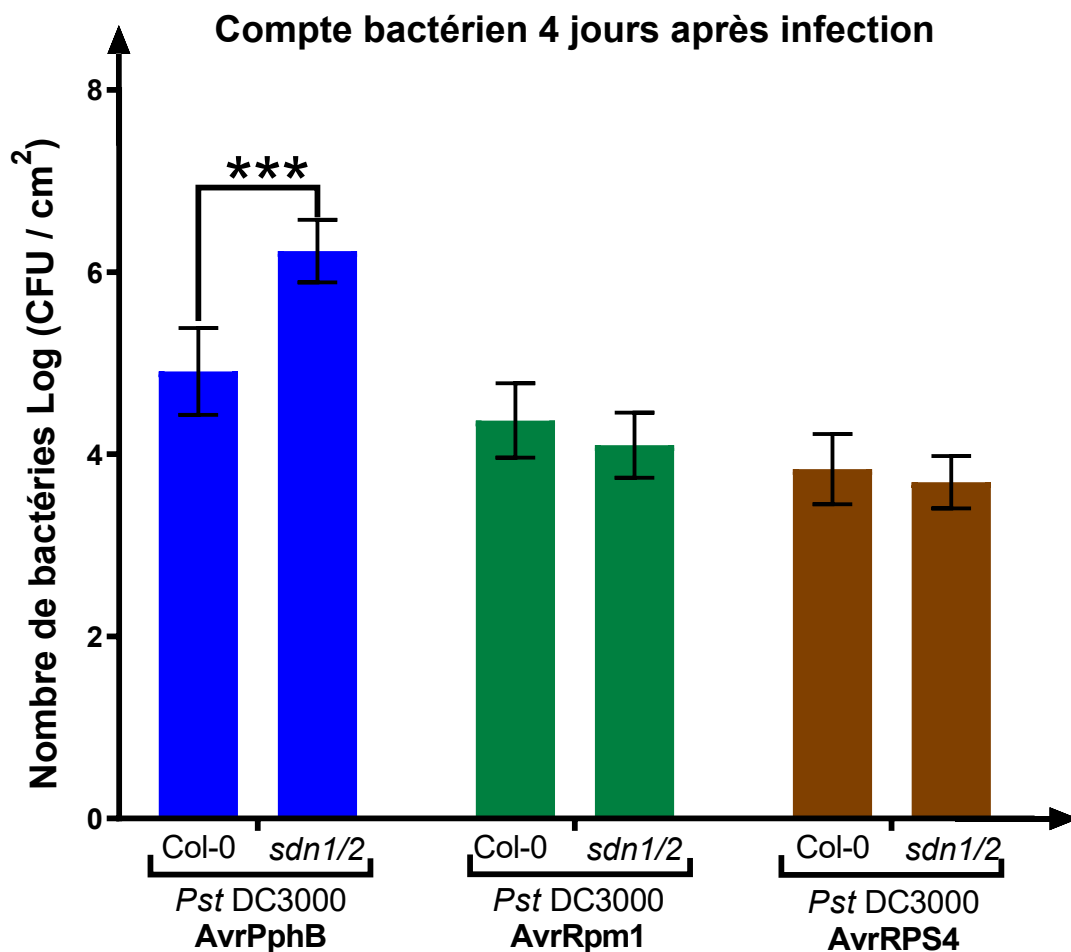


Figure 12. Rôle des protéines SDN dans la mise en place de la résistance

Les feuilles de plantes ont été infiltrées avec 5×10^5 bactéries *P. syringae* exprimant séparément les effecteurs AvrPphB, AvrRpm1 et AvrRps4. Des disques foliaires ont été prélevés quatre jours après infection pour faire un compte bactérien. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les moyennes de 9 réplicas (3 réplicas biologiques et chaque réplica biologique est fait en triplicata technique). Les astérisques *** désignent les différences statistiquement significatives selon le test t où $P < 0,05$

Par la suite, le rôle des protéines SDN dans les voies immunes induites par RPS5/AvrPphB menant à la mise en place d'une résistance hautement spécifique a été approfondi. Ainsi, des marqueurs de la voie ETI ont été quantifiés chez des plantes sauvages (Col-0) de même que chez le double mutant *sdn1/2* suite à l'infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB). Au cours de notre expérimentation, les plantes *rps5* ont été utilisées comme contrôle négatif dû à leur déficience au niveau de la protéine de résistance RPS5. La protéine PR1 a été utilisée comme marqueur de la voie de l'AS essentielle à la résistance aux agents pathogènes activée lors de l'induction de la voie ETI. Des feuilles infiltrées ont par la suite été prélevées à 0 et 24 heures après infection afin d'effectuer des immunobuvardages de type western Blot en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine PR1 (Cedarlane). Le système RPM1/AvrRpm1, dans lequel les protéines SDN ne sont pas requises pour mettre en place une résistance efficace contre *Pst* DC3000 (AvrRpm1), a été utilisé à titre de contrôle négatif. Les résultats ont montré que les effecteurs AvrPphB et AvrRpm1 induisent une forte accumulation de la protéine PR1 après 24 heures d'infection chez les plantes sauvages (Figure 13A et 13B). En revanche, cette activation est compromise chez les plantes *sdn1/2* en réponse à l'effecteur AvrPphB et ce qui n'est pas le cas en présence de l'effecteur AvrRpm1 (Figure 13A et 13B). En effet, les plantes *rps5* et *rpm1-3* n'ont pas réagi à la présence de l'effecteur AvrPphB et AvrRpm1, ce qui est attendu puisqu'elles sont déficientes respectivement au niveau du récepteur RPS5 et RPM1 (Figure 13A et 13B). Ces résultats permettent donc de conclure qu'à la différence du système RPM1/AvrRpm1, les protéines SDN contrôlent l'accumulation de la PR1 dans le système RPS5/AvrPphB, ce qui concorde avec les résultats présentés dans la Figure 12.

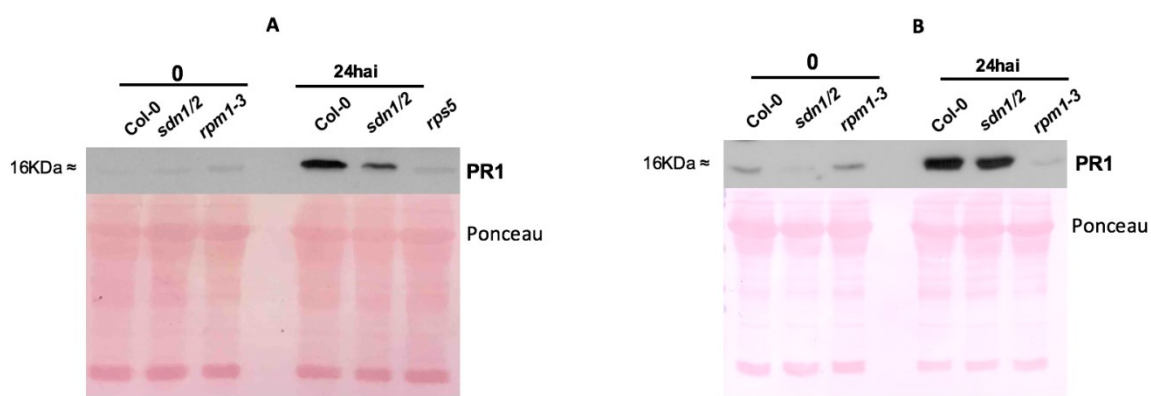


Figure 13. Les protéines SDN contrôlent l'accumulation de la PR1 induite par RPS5/AvrPphB

Western blot montrant l'accumulation de la protéine PR1 en réponse à l'infection. Les plantes sont infectées avec *Pst* DC3000 (AvrPphB) (A) et *Pst* DC3000 (AvrRpm1) (B). Les plantes *rps5* et *rpm1-3* sont respectivement déficientes au niveau de RPS5 et RPM1. Les échantillons sont récoltés à 0 et 24 heures après infection (hai) pour faire des immunobuvardages de type western. La masse totale de protéine déposée dans chaque puits du gel est de 30µg. L'anticorps primaire anti PR1 est dilué à 1/5000 et l'anticorps secondaire à 1/12000. La membrane, colorée au rouge ponceau, montrant la RUBISCO sert comme contrôle interne montrant que les quantités de protéines déposées sont comparables entre les échantillons.

Comme la PR1 est sous le contrôle principalement de l'AS, un messager secondaire essentiel à la mise en place de la voie ETI, une quantification de ce métabolite a été faite à partir des plantes sauvages (Col-0), *sdn1/2* et *rps5* à 0 et 24 heures après infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB). Les résultats montrent que l'effecteur AvrPphB induit une accumulation de l'AS chez les plantes sauvages (Figure 14). Néanmoins, cette accumulation est significativement réprimée chez les plantes *sdn1/2* et *rps5* (Figure 14). Ainsi, ces expériences nous ont permis

de montrer l'importance des protéines SDN dans l'activation de la voie de l'AS requise pour la mise en place de l'immunité médiée par RPS5/AvrPphB.

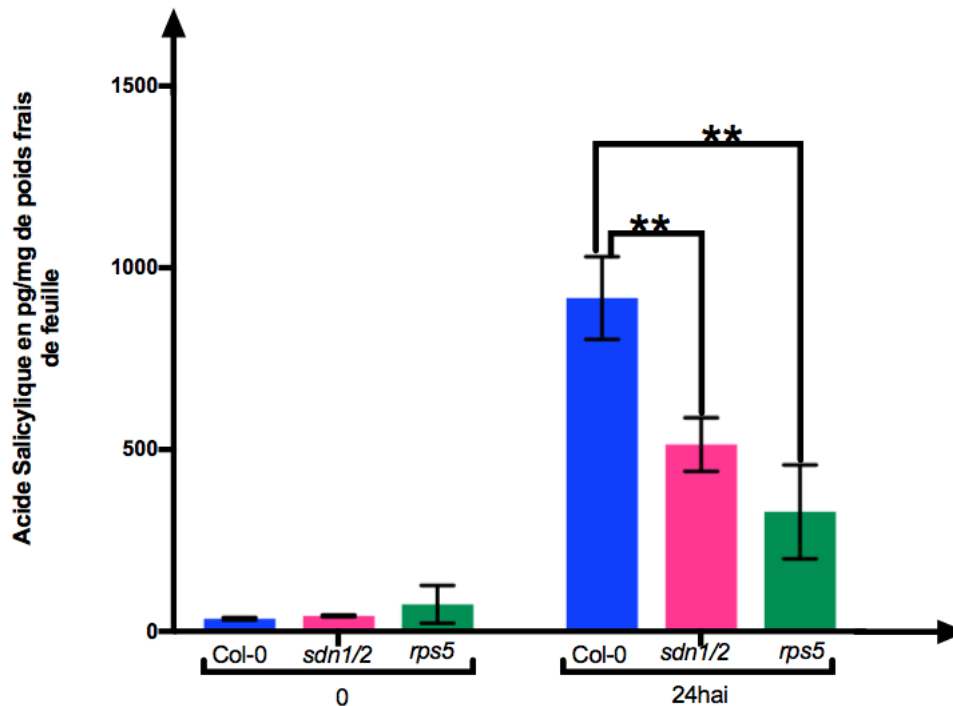


Figure 14. Les protéines SDN contrôlent l'accumulation de l'AS dans le système RPS5/AvrPphB

Les feuilles de plantes ont été infiltrées avec 10^7 bactéries *Pst* DC3000 (AvrPphB). Les échantillons récoltés à 0 et 24 heures après infection (hai) ont été envoyés au CHUS pour le dosage de l'AS. Les barres d'erreur représentent l'écart-type entre les moyennes de 3 répliques biologiques. Les astérisques *** désignent les différences statistiquement significatives selon le test t où $P < 0,05$.

2.2.2 Caractérisation des transcrits et des miARN régulés par l'ETI et qui sont sous contrôle des protéines SDN.

Pour caractériser des transcrits et des miARN régulés par l'ETI sous le contrôle des protéines SDN, le système RPS5/AvrPphB a été disséqué. Les résultats ont montré avec l'objectif 1 l'importance des protéines SDN dans la mise en place d'une résistance hautement spécifique. Les protéines SDN contrôlèrent donc des miARN régulateurs négatifs des voies immunes médiées par RPS5/AvrPphB. Il est connu que la voie de signalisation et les réponses de défense induites lors de la voie ETI sont communes et conservées entre les différents systèmes activant cette voie. Comme la voie ETI induite par d'autres effecteurs (AvrRpm1 et AvrRps4) n'est pas affectée, il est fort probable que les miARN contrôlés par les protéines SDN agissent sur des cibles impliquées au niveau de la reconnaissance entre RPS5 et AvrPphB. C'est-à-dire qu'il existerait probablement des transcrits ou des miARN en lien direct avec RPS5 et qui sont régulés via la voie de contrôle des protéines SDN. Pour tester cette hypothèse, le niveau d'expression de RPS5 a donc été quantifié dans les plantes Col-0 VS *sdn1/2*. Remarquablement, le niveau du transcrit RPS5 est réprimé significativement après 2h d'infection en présence de l'effecteur AvrPphB chez les plantes *sdn1/2* en comparaison avec celui observé chez les plantes Col-0 (Figure 15). Ce résultat est fort intéressant, il montre que les protéines SDN contrôlent le niveau de RPS5 en réponse à l'infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB).

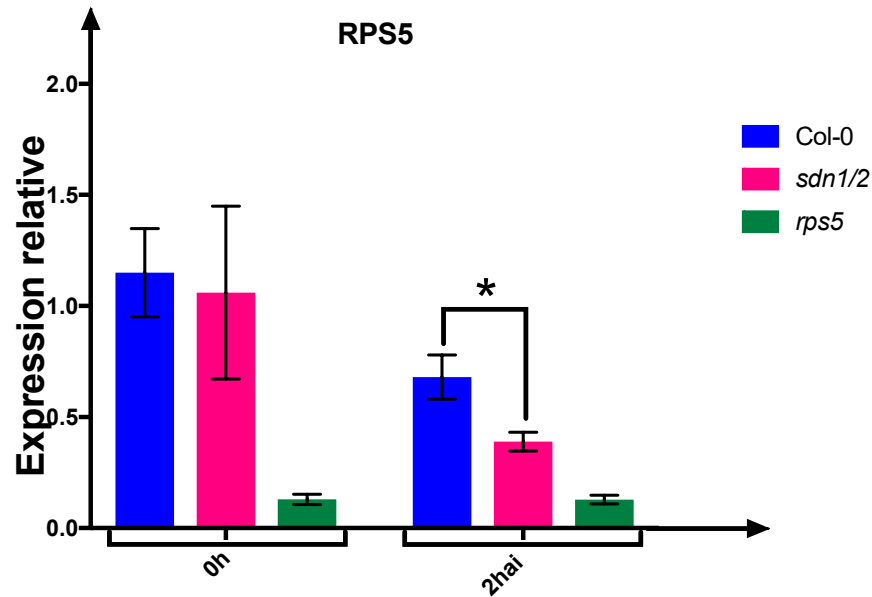


Figure 15. SDN1/2 contrôlent l'accumulation de RPS5

Des échantillons de feuille non traitée et celle traitée avec 10^7 bactéries *Pst* DC3000 (AvrPphB) ont été prélevés 2 heures après infection (hai) pour faire une extraction d'ARN suivi de l'ADNc. Des qPCR (PCR quantitative « Polymerase chain reaction ») ont été réalisées afin d'étudier le niveau d'expression du gène *RPS5* entre les lignées Col-0, *sdn1/2* et *rps5*. La barre d'erreur représente l'écart-type de trois répliques biologiques. L'astérisque * désigne une différence statistiquement significative selon le test t où $P < 0,05$.

RPS5 ressent la modification exercée par AvrPphB sur la protéine de garde PBS1 et induit par la suite la voie immune menant à la destruction de l'agent pathogène. Il a également été intéressant d'étudier tous les homologues de PBS1 à savoir PBL1 (AvrPphB sensitive 1-like 1), PBL2 (avrPphB sensitive 1-like 2) et BIK1 (Botrytis-induced kinase 1) (Ranf *et al.*, 2014). Le niveau d'expression de ces gènes a été quantifié chez les plantes Col-0, *sdn1/2* et *rps5* à 0h et 2 heures après infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB). Comme le montre la Figure 16, les niveaux d'expression de PBS1, BIK1, PBL1 et PBL2 sont comparables chez les plantes Col-0,

sdn1/2 et *rps5* à 0 et 2 hai. Ces données suggèrent que les protéines SDN1/2 ne contrôlent pas les niveaux d'accumulation de ces Protéines avant et 2 hai.

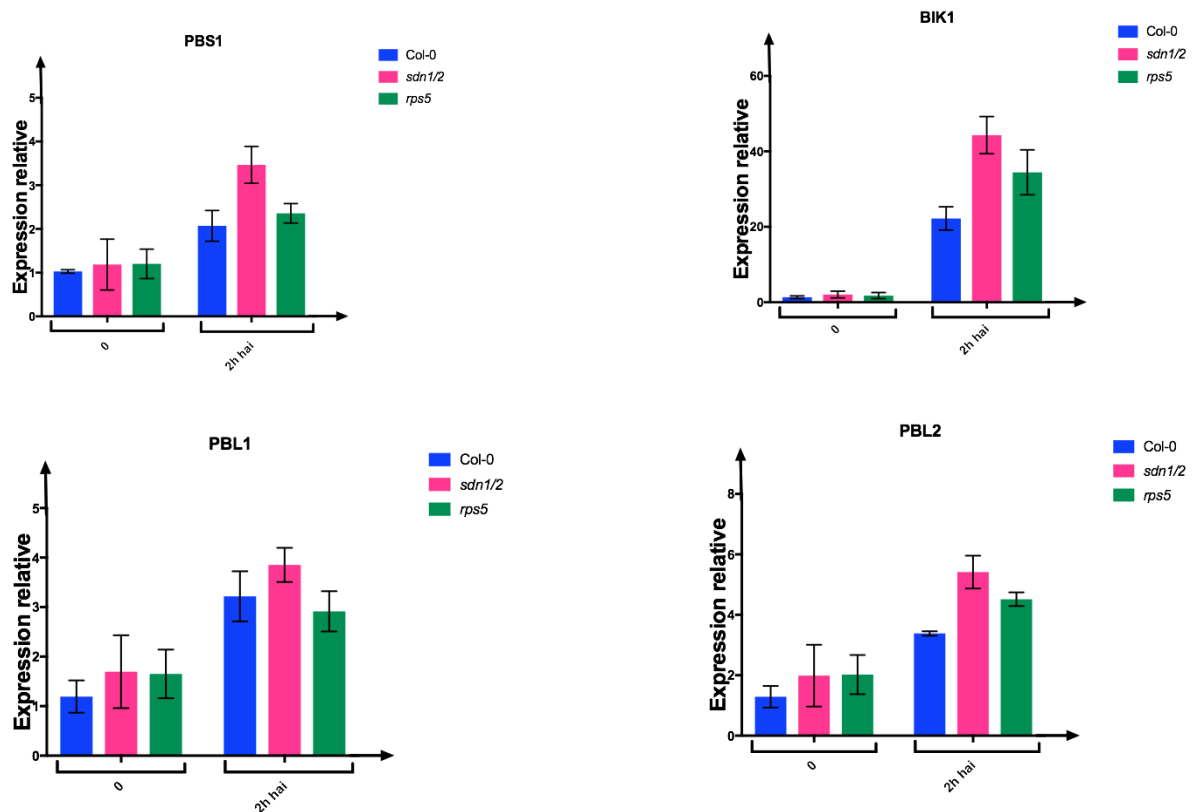


Figure 16. SDN1/2 ne régulent pas l'accumulation des transcrits PBS1 et ses homologues.

Des échantillons de feuilles non traitées et celles traitées avec 10^7 bactéries *P. syringae* exprimant l'effecteur AvrPphB ont été prélevés 2 heures après infection (hai) pour faire une extraction d'ARN suivi de l'ADNc. Des qPCR ont été réalisées afin d'étudier le niveau d'expression des gènes PBS1, BIK1, PBL1 et PBL2, entre les lignées Col-0, *sdn1/2* et *rps5*. La barre d'erreur représente l'écart-type de trois répliques biologiques.

Bien que les protéines SDN ne jouent pas un rôle dans les niveaux d'expression des protéines de garde (Figure 16), les résultats montrent une plus forte accumulation de RPS5 chez Col-0

comparativement au mutant *sdn1/2* (Figure 15). L'étape suivante a donc été d'étudier des cibles directes de RPS5 qui peuvent être contrôlées via les protéines SDN. Ce qui a fait penser à une famille de protéines appelée ADF (Actin-Depolymerizing Factor) dont le rôle principal est de cliver l'actine filamenteuse. Chez *Arabidopsis*, cette famille comprend 11 gènes qui, en fonction de leur parenté, ont été regroupés en quatre sous-classes (Porter *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2009). En exemple, les gènes de la sous-classe I qui comprennent *ADF1*, *ADF2*, *ADF3* et *ADF4* sont ceux les plus étudiés pour leur contribution dans la défense chez les plantes. Parmi ces gènes, seul *ADF4* joue un rôle dans l'augmentation de l'accumulation de l'ARNm de RPS5 (Porter *et al.*, 2012 ; Tian *et al.*, 2009). Le niveau d'expression de *ADF4* a été quantifié chez le Col-0 et les mutants *sdn1/2* de même que chez *rps5* à 0 et après 2h d'infection avec la souche avirulente *Pst* DC3000 (AvrPphB). Comme le montre la Figure 17, il n'y a pas de différence significative avant et après infection entre Col-0, *sdn1/2* et *rps5*. Les protéines SDN n'influencent donc pas le niveau d'accumulation de RPS5 via le transcrit *ADF4*.

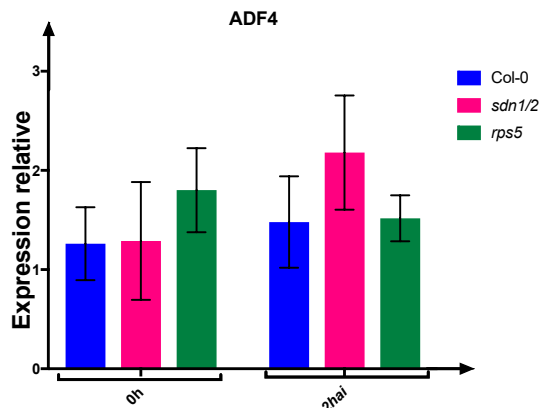


Figure 17. SDN1/2 ne régulent pas les niveaux d'accumulation de ADF4, un facteur de transcription qui régule l'expression de RPS5.

Des échantillons de feuille non traitée et celle traitée avec 10^7 bactéries *P. syringae* exprimant l'effecteur AvrPphB ont été prélevés 2 heures après infection (hai) pour faire une extraction d'ARN suivi de l'ADNc. Des qPCR ont été réalisées afin d'étudier le niveau d'expression des gènes ADF4 entre les lignées Col-0, *sdn1/2* et *rps5*. La barre d'erreur représente l'écart-type de trois répliques biologiques.

Ce résultat, a permis de se questionner sur l'implication des miARN régulés chez la plante en réponse aux traitements par des éliciteurs. D'ailleurs, le transcrit RPS5 est une cible confirmée du miR472 et est clivée par ce dernier (Boccarda *et al.*, 2014). Comme *Arabidopsis* possède le gène miR472, ces données ont poussé à vérifier le niveau d'expression du miR472 chez les plantes Col-0, *sdn1/2* et *rps5* à 0 et 2h après infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB). Une analyse par qPCR du miR472 avec les plantes Col-0, *sdn1/2* et *rps5*, n'a pas obtenu une différence significative entre les trois lignées à 0 et 2h (Figure 18). Ce résultat suggère que les protéines SDN1/2 ne contrôlent donc pas l'homéostasie du miR472.

Par la suite, des études supplémentaires sont effectuées, à partir d'un programme d'analyse (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>), afin de déterminer si la plante *Arabidopsis* possède d'autres miARN qui cibleraient RPS5.

Les recherches montrent la présence d'autres miARN qui ciblerait RPS5. Il s'agit du miR5020, miR5025, miR5632 et miR835. Pour continuer, il a été question de savoir si les protéines SDN jouent un rôle dans la régulation de l'accumulation de ces miARN, afin d'optimiser la réponse médiée par RPS5/AvrPphB. Ainsi, leur niveau d'expression a été quantifié comme décrit ci-dessus chez les plantes Col-0, *sdn1/2* et *rps5* à 0 et 2 heures après infection par *Pst* DC3000 (AvrPphB). En observant la Figure 18, les niveaux d'expression du miR835 et miR5632 sont comparables chez les plantes Col-0, *sdn1/2* et *rps5*. Ceci nous permet donc de conclure qu'il n'y a pas de lien entre les protéines SDN, les niveaux de RPS5 et ces miARN. Par contre, nous voyons une différence significative dans l'expression du miR5020 entre le Col-0 et le mutant *sdn1/2* après 2h d'infection avec la souche *Pst* DC3000 (AvrPphB) (Figure 18). Ceci pourrait donc expliquer la diminution de RPS5 qui serait clivée par le miR5020 en absence des protéines SDN. Cette expérience a été faite une fois. Cependant, si ces données sont reproductibles, d'autres expériences avec des graines mutées au niveau de ce *miR5020* (Salk_069647) seraient très intéressantes à tester afin d'étudier les niveaux de RPS5 en comparaison avec la plante sauvage Col-0. Il serait également possible d'étudier les réponses de défense de la plante afin de caractériser son importance dans la résistance hautement spécifique induite par RPS5/AvrPphB.

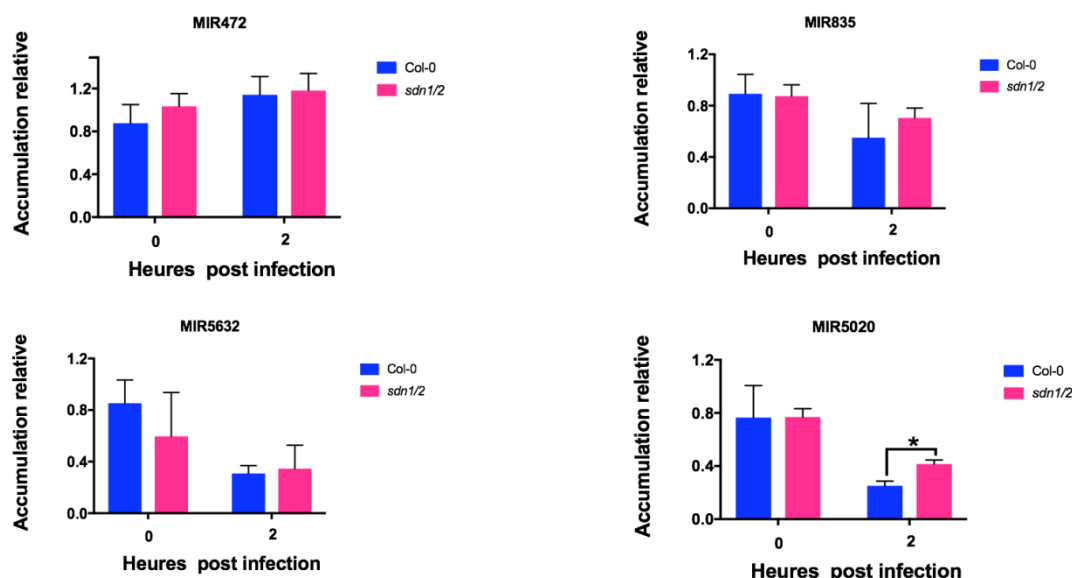


Figure 18. Le niveau du miR5020 est contrôlé par les protéines SDN1/2 en réponse à l'infection par la souche de *P. syringae* exprimant l'effecteur *AvrPphB*

Des échantillons de feuilles non-traitées et celles traitées avec 10^7 bactéries *P. syringae* exprimant l'effecteur *AvrPphB* ont été prélevés 2 heures après infection (hai) pour faire une extraction d'ARN suivi de l'ADNc. Des qPCR ont été réalisées afin d'étudier le niveau d'expression des gènes miR472, miR835, miR5632 et miR5020 entre les lignées Col-0 et *sdn1/2*. La barre d'erreur représente l'écart-type de trois répliques biologiques. L'astérisque * désigne une différence statistiquement significative selon le test t où $P < 0,05$.

2.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré le rôle de protéines SDN dans la résistance hautement spécifique induite par les effecteurs bactériens de *P. syringae* chez la plante modèle *Arabidopsis*. En général, les plantes résistent contre les agents pathogènes et peuvent inhiber leur croissance (Kourelis *et al.*, 2016; Lakatos *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012 ; Yang et Li, 2018;

Zhang *et al.*, 2010). En observant les résultats obtenus lors de la comparaison des différents systèmes protéines R/effecteurs (Figure 12), le résultat obtenu avec les plantes *sdn1/2* dans le système RPS5/AvrPphB apporte une preuve directe de l'importance de ces protéines dans la mise en place de l'immunité. En effet, en absence de ces protéines, nous avons observé une augmentation de la prolifération des bactéries. Il s'agit en effet de la première fois que l'importance du contrôle de l'homéostasie des miARN dans la mise en place de l'immunité chez les végétaux est démontrée. Par ailleurs, l'homéostasie des miARN peut être contrôlée à plusieurs niveaux, telle qu'au niveau de la transcription de l'ADN du gène *MIR*, de la synthèse des précurseurs et de l'accumulation de miARN matures (Sanei et Chen, 2015). Les protéines SDN ont été identifiées par plusieurs auteurs (Ameres *et al.*, 2010; Kamminga *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Ramachandran et Chen, 2008; Yu *et al.*, 2017) comme appartenant à la famille d'exonucléases 3' → 5' et dégraderaient des miARN matures. En effet des plantes déficientes au niveau de SDN1, 2 et 3 ont montré des niveaux élevés de miARN endogènes et des défauts de développement (Ramachandran et Chen, 2008). Dans les cellules, la protéine SDN1 se lie préférentiellement aux substrats de miARN non uridylé simple brin. De plus, leur activité est partiellement inhibée par la méthylation des miARN (Ramachandran et Chen, 2008) qui normalement joue un rôle protecteur pour éviter leur dégradation.

Nous avons montré que les protéines SDN jouent un rôle important dans la voie de résistance médiée par le système RPS5/AvrPphB. Les résultats montrent (Figure 13, Figure 14) aussi que ces protéines SDN contrôlent l'accumulation de l'AS et de la PR1 activée par le système RPS5/AvrPphB. En effet, en utilisant les trois systèmes d'effecteurs et de protéines R, seul le système (RPS5/AvrPphB) est affecté par la présence des protéines SDN1/2 comparativement aux deux autres systèmes (RPM1/AvrRpm1 ; RPS4/AvrRps4) (Figure 12). Hors, il est connu que tous les trois systèmes utilisés dans cette étude requièrent la voie de l'AS pour activer la résistance. Par conséquent il est logique de penser que SDN1/2 aurait un effet au niveau de la zone de reconnaissance entre effecteur et la protéine R vue que les cibles des effecteurs sont distinctes. Par exemple, l'effecteur AvrRps4 cible directement la protéine de résistance RPS4. Par contre, les effecteurs AvrRpm1 et AvrPphB interagissent et modifient respectivement les

protéines de garde RIN4 et PBS1. Les modifications sont par la suite ressenties par les protéines de résistance respectives RPM1 et RPS5 (Ade *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2002). Il est donc apparu comme une évidence que le contrôle de l'homéostasie des miARN touche cette zone de reconnaissance. Pour continuer, nous avons vérifié si les cibles des effecteurs sont affectées par l'absence du contrôle de l'homéostasie en quantifiant les niveaux des transcrits PBS1 et ces homologues PBL1, PBL2 et BIK1. En effet, il est connu que AvrPphB clive PBS1, mais aussi PBL1 et BIK1, des acteurs impliqués dans la voie PTI en plus de les cibler. Le résultat de ces expériences a démontré que les protéines SDN ne contrôlent pas les niveaux d'accumulation des co-récepteurs PBS1, PBL1, PBL2 et BIK1 (Figure 16). Il a alors été quantifié le niveau d'expression de la protéine de résistance RPS5. Remarquablement, le niveau du transcrit RPS5 est réprimé significativement chez ce double mutant *sdn1/2* en réponse à l'infection par *P. syringae* exprimant l'effecteur AvrPphB (Figure 15). Ce résultat pourrait expliquer la diminution de la réponse immunitaire chez le double mutant *sdn1/2*. De plus la protéine ADF4 a été identifiée dans la modulation de l'expression de RPS5. Cependant, cette protéine ADF4 ne semble pas être contrôlée par SDN1/2 (Figure 17). Il est connu que plusieurs miARN et transcrits codants sont régulés chez la plante en réponse aux traitements par des éliciteurs. D'ailleurs, il est connu que le miR472 et la polymérase RDR6 sont impliqués dans le contrôle des niveaux des transcrits de certains gènes de résistance incluant RPS5 (Boccaro *et al.*, 2014).

En ce qui concerne les miARN, le niveau du miR5020 est plus important chez les plantes *sdn1/2* par rapport aux plantes sauvages en réponse à l'infection. Ce qui corrèle négativement avec le niveau du transcrit RPS5 chez ces plantes. Le miR5020 est un micro-ARN qui aurait été régulé positivement chez les plantes transgéniques surexprimant l'effecteur SAP11 (SAP11AYWB) par rapport aux plantes de type sauvage (Lu *et al.*, 2014). Cet effecteur est une protéine effectrice déstabilisant des éléments chez *Arabidopsis* impliqués dans le développement et la défense. Cette action active l'expression de plusieurs miARN afin de stabiliser la situation. Parmi les miARN découverts par l'équipe de Lu *et al.*, (2014), le miR5020 aurait été régulé négativement chez les plantes transgéniques surexprimant

l'effecteur SAP11 (SAP11AYWB) par rapport aux plantes de type sauvage. Cependant, la fonction exacte du mir5020 au cours de cette étude n'a pas été définie. Mon travail est donc le premier à signaler le rôle du mir5020 dans la défense des plantes en réponse à *P. Syringae*.

2.4 Matériels et méthodes

2.4.1 Matériel végétal et conditions de croissance

-Matériel végétal

La plante *A. thaliana* a été utilisée comme modèle dans ce projet. Aussi, les plantes sauvages Columbia-0 (Col-0) ainsi que des types doubles mutants déficients en SDN1 et SDN2 (*sdn1/2*) ont été utilisées dans toutes les expériences (Ramachandran et Chen 2008). De même, les plantes *rps5* et *rpm1-3* sont incluses dans certaines expériences comme contrôles négatifs. Elles sont déficientes respectivement au niveau des protéines de résistance RPS5 et RPM1.

-Croissance des plantes

Les graines des lignées d'*Arabidopsis* nommées précédemment ont été semées dans des petits pots en plastique contenant de la tourbe sans engrais. Les pots ont ensuite été transférés dans une chambre noire, froide à 4 °C pendant 2 jours pour permettre une activation synchronisée de la germination. Par la suite, elles ont été placées dans une chambre de croissance pendant 4 à 5 semaines. La chambre de croissance était à 22-23°C le jour et à 19°C pendant la nuit, avec 12 heures de lumière fluorescente de jour et 70% d'humidité relative.

2.4.2 Culture des souches de *Pseudomonas* (*Pst* DC3000)

Les souches de *Pst* DC3000 exprimant séparément les effecteurs AvrPphB, AvrRps4 et AvrRpm1 ont été striées à partir d'un stock de glycérol conservé à -80 °C sur des plaques de milieu King B (KB) (Annexe) contenant deux antibiotiques : la *kanamycine* (50 µg/ml) et la *rifampicine* (10µg/ml). Une colonie de chaque souche a ensuite été transférée dans une culture liquide de KB (Annexe) avec les mêmes antibiotiques et incubée pour environ 16h avec agitation à 200rpm à 28°C. La culture a été recueillie dans un tube stérile et a été centrifugée durant 15minutes à 3800 rpm pour ensuite retirer le surnageant et remettre les bactéries en suspension dans 10 mM de MgCl₂. Le culot obtenu a été lavé deux fois dans du MgCl₂ 10mM après une centrifugation de 15min à 3800 rpm avant d'être resuspendu avec du MgCl₂. La densité optique (DO) de la suspension des cellules bactériennes a été quantifiée par spectrophotomètre à 600 nm. Pour les comptes bactériens la DO mesurée a été de 0,0002 (1 x 10⁵ unités formant des colonies / ml) tandis qu'elle a été de 0,02 (1 x 10⁷ unités formant des colonies / ml) pour les résultats de western blot et de qPCR.

2.4.3 Infection avec les souches Avirulentes de *Pst* DC3000

Pour ne pas se mêler entre les feuilles, trois feuilles de chaque lignée de plantes ont été marquées. Ensuite, le côté abaxial a été utilisé pour infiltrer les espaces intracellulaires des feuilles avec des seringues sans aiguille de 1 ml. Les feuilles ont par la suite été infiltrées par des suspensions bactériennes décrites ci-dessus. Elles ont été de plus laissées, séchées entre 1 à 2h puis les pots ont été déposés sur une sébile avec un peu d'eau. Les plantes ont ensuite été recouvertes d'un film transparent à moitié ouvert avant d'être ensuite transférées dans la chambre de croissance. Après une incubation de 24h, les protéines et l'ARN ont été extraits de ces végétaux. D'autres incubations ont nécessité 4 jours avant de procéder au compte

bactérien. Les extractions de protéines et d'ARN ont été conservées à -80°C pour la suite des expériences.

2.4.4 Échantillonnage et croissance bactérienne 4 jours

Les feuilles entières infectées ont été coupées et désinfectées par des séries de lavage avec des solutions d'éthanol à 70% pendant 1 minute, puis lavées deux fois avec une solution de $MgCl_2$. Ensuite, les feuilles ont été essuyées avec du papier wattman et des disques foliaires ont été coupés avec un perce-bouchon de 0,4 cm². Pour poursuivre, deux disques foliaires d'un seul échantillon ont été placés dans un tube de 1,5 ml contenant 100 µL de $MgCl_2$, en triplicata. Les disques ont été ensuite broyés et pour un volume final de 660 µL, 560 µL de $MgCl_2$ sont ajoutés. Une série de dilution de 1:10 jusqu'à 10^{-4} est effectuée et 10 µl de chaque dilution ont été déposés, en triplicata, sur un milieu sélectif : milieu KB solide avec deux antibiotiques, la *kanamycine* (50 µg/ml) et la *rifampicine* (10 µg/ml). Les boîtes ont ensuite été incubées à 28°C pendant 48h avant de procéder au compte bactérien.

2.4.5 Extraction des protéines et Immunobuvardage de type western

-Extraction des protéines

Les échantillons mis à -80°C ont été broyés, dans de l'azote liquide et 250-300 mg de tissus végétaux a été utilisé pour effectuer des extractions de protéines suite à l'ajout de 200µl de tampon d'extraction de protéine (Annexe). L'ensemble a été mis sous agitation (900rpm) à 4°C pendant 30min. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 13000 rpm pour 15min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un autre tube et on a mesuré la concentration des protéines

extraites à la spectrophotométrie (smart spectrophotometer Tm Plus, BIORAD) selon la méthode de Bradford en utilisant la courbe standard du sérum bovin (BSA).

-Immunobuvardage de type western

Une solution de tampon de charge (4X) (Annexe) avec 30 µg de protéine a été dénaturée à 95°C pendant 5min. Il s'en est suivi une migration dans un champ électrique (SDS-PAGE) sur un gel de polyacrylamide concentrateur de 4% séparateur de 15% (Annexe). La migration a ensuite été suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose (BioRad) dans une solution tampon tris-glycine (Annexe) en présence d'un champ électrique, à 4°C. La membrane a été ensuite bloquée (Annexe) et incubée avec l'anticorps primaire, anti-PR1 (1/5000) (de Abiocode, CEDARLANE) à 4°C « over-night ». Il s'en est suivi une deuxième incubation avec l'anticorps secondaire anti-rabbit (1/12000) et une troisième avec le ECL (Clarty Western ECL, BIORAD). Finalement, la membrane a été développée sur un film de chimiluminescence (Amersham Hyperfilm TM ECL) pour obtenir les résultats.

2.4.6 Dosage de l'acide salicylique

Pour la quantification de l'acide salicylique libre, les feuilles des plantes ont été homogénéisées avec l'azote liquide en poudre. Cette poudre obtenue est ensuite dosée avec la collaboration de Phenoswitch biosciences par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLCMS). Pour cela, 500µl de méthanol contenant 0.01ng/µl d'acide salicylique ont été ajoutés dans les échantillons. Il s'en est suivi une incubation à 4°C pendant 30 minutes avec agitation en plus d'une centrifugation. Le surnageant obtenu a été ensuite dilué 10 fois avec une préparation de 50Mm d'acétate d'ammonium à pH 7. Les échantillons ont par la suite été préparés avec de l'acétonitrile avant d'être lavés avec 50mM d'acétate

d'ammonium et chargés. Avant l'élution avec 5% d'hydroxyde d'ammonium les échantillons ont été à nouveau lavés avec 50mM d'acétate d'ammonium. L'éluat est enfin séché puis mis en suspension dans 50µl d'eau contenant 0.2% d'acide formique et 10mM de formate d'ammonium avant de procéder à la quantification de l'acide salicylique. Le dosage a été effectué sous un mode négatif avec ABSciex TripleTOF 5600 (ABSciex, Foster City, CA, USA) équipé d'une interface electrospray à 50 µm iD capillaire et couplé à un Eksigent µUHPLC (Eksigent, Redwood City, CA, USA). Le logiciel Analyst TF 1.7 a été utilisé pour le contrôle de l'instrument et l'acquisition des données.

2.4.7 Extraction d'ARN, synthèse de l'ADNc et qPCR

- Extraction d'ARN :

L'extraction de l'ARN des échantillons a été réalisée avec le Kit 'RNeasy Plant Mini Kit' de Qiagen, USA en suivant les instructions du fournisseur. L'ARN extrait a été traité avec la DNase afin d'éliminer tout résidu d'ADN puis a été quantifié à l'aide d'un nano-spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

- synthèse de l'ADNc : la synthèse de l'ADNc a été réalisée avec 2µg d'ARN par une transcription reverse en utilisant une solution MIX (Annexe) contenant du SuperScriptII Reverse Transcriptase de (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) dans un volume total de 20µl. L'incubation s'est déroulée à 42°C durant 90 minutes suivies d'une phase finale de 10 minutes à 70°C.

- qPCR : à partir de l'ADNc, une quantification du gène cible a été réalisée avec le système CFX96 de Bio-Rad. Les échantillons à tester ont été placés dans un volume de 20µl dans lequel se trouve d'ADNc, le mix de Advanced qPCR Master mix (WISSENT), des amorces

(Annexe) spécifiques et de l'eau stérile. Le programme de PCR (*Polymerase chain reaction*) a été de 40 cycles, comprenant une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes suivi d'une deuxième étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes avant de passer à l'étape d'hybridation des amorces spécifiques à 60°C pour une 1 minute. Pour l'analyse de l'expression des gènes, un calcul a été effectué à partir de la moyenne de la Cq (cycle seuil) des 3 répliques réalisés pour chaque échantillon et en incluant un gène de référence endogène, le EF1, dans les mêmes conditions. Il s'en est suivi une normalisation des valeurs de Cq pour chaque échantillon et pour chaque gène utilisé par rapport à leur valeur de gène de référence correspondante.

2.4.8 Extraction des miARN, synthèse de l'ADNc et qPCR

- Extraction des miARN

Tout d'abord, nous avons effectué une extraction de l'ARN total avec le Kit 'RNeasy Plant Mini Kit' de Qiagen, USA en suivant les instructions du fournisseur. 25 µg d'ARN ont été ensuite mis sur la colonne RNeasy (QUIAGEN) puis ont été centrifugés à 8000rpm pendant 30 secondes à 4 °C. Le surnageant contenant de petits ARN a été recueilli dans un nouveau tube sans RNase. Le volume obtenu a été précipité par 70 µl d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 540 µl d'isopropanol avant d'être incubé pendant 10 minutes sur de la glace. Ensuite, une deuxième centrifugation a été effectuée à 10000rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot issu de la centrifugation a été lavé avec 80% d'éthanol et centrifugé pour une troisième fois à 10000rpm durant 5 minutes à 4 °C. Ces deux dernières étapes ont été répétées avant d'éluer les petits ARN dans 20 µl d'eau certifiée sans ARNase.

- Synthèse de l'ADNc et qPCR

La transcription inverse a été réalisée avec une amorce de tige boucle conçue par Chen et al. (2005) et qui s'hybride spécifiquement aux brins de miARN. Les étapes de l'ADNc et de la qPCR sont décrites par Erika et al. (2007). Tout d'abord, nous avons préparé une solution sans miARN (Annexe). Ce mélange a ensuite été chauffé à 65°C environ 5min puis transféré dans de la glace durant 2min. Après avoir été centrifugée brièvement, une autre solution Mix (Annexe) a été rajoutée à ce mélange sans miARN suivi d'une étape de la transcription inverse. 5ul de miARN a été rajouté au mélange sans miARN total et une transcription inverse a été réalisée avec un programme pendant 30min à 16°C. Les conditions du programme ont été de 60cycles d'une RT de 30°C pour 30s, 42°C pour 30s et 50°C pour 1s. Une incubation de 85°C pendant 5min a été ajoutée dans le but d'inhiber la transcriptase inverse. Enfin, une qPCR a été réalisée comme décrit par Erika *et al.* (2007)

Remerciements

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de recherche du professeur Kamal Bouarab de l'université de Sherbrooke. Je remercie également les organismes subventionnaires du projet le CRSNG et le centre SÈVE.

Références

- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W. (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2531–2536.
- Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA–directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328, 1534–1539.

- Boccaro, M., Sarazin, A., Thiebauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., and Colot, V. (2014). The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP-and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathogens* 10, e1003883.
- Crabill, E., Joe, A., Block, A., Van Rooyen, J.M., and Alfano, J.R. (2010). Plant immunity directly or indirectly restricts the injection of type III effectors by the *Pseudomonas syringae* type III secretion system. *Plant Physiology* 154, 233–244.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323.
- Kamminga, L.M., Luteijn, M.J., Den Broeder, M.J., Redl, S., Kaaij, L.J., Roovers, E.F., Ladurner, P., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *The EMBO Journal* 29, 3688–3700.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The Arabidopsis thaliana-*Pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 1.
- Khan, M., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology* 29, 49–55.
- Kourelis, J., van der Hoorn, R.A., and Sueldo, D.J. (2016). Decoy engineering: the next step in resistance breeding. *Trends in Plant Science* 21, 371–373.
- Lakatos, L., Szittya, G., Silhavy, D., and Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal* 23, 876–884.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1790–1795.

- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., and Zhou, J.-M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology* 152, 2222–2231.
- Lu, Y.-T., Li, M.-Y., Cheng, K.-T., Tan, C.M., Su, L.-W., Lin, W.-Y., Shih, H.-T., Chiou, T.-J., and Yang, J.-Y. (2014). Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant Physiology* 164, 1456–1469.
- Porter, K., Shimono, M., Tian, M., and Day, B. (2012). Arabidopsis Actin-Depolymerizing Factor-4 Links Pathogen Perception, Defense Activation and Transcription to Cytoskeletal Dynamics. *PLoS Pathogens* 8.
- Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321, 1490–1492.
- Sanei, M., and Chen, X. (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Current Opinion in Plant Biology* 27, 199–206.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon, J.E. (2002). A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575–588.
- Tian, M., Chaudhry, F., Ruzicka, D.R., Meagher, R.B., Staiger, C.J., and Day, B. (2009). Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the Pseudomonas syringae effector AvrPphB. *Plant Physiology* 150, 815–824.
- Wang, X., Wang, Y., Dou, Y., Chen, L., Wang, J., Jiang, N., Guo, C., Yao, Q., Wang, C., and Liu, L. (2018). Degradation of unmethylated miRNA/miRNA* s by a DEDDy-type 3' to 5' exoribonuclease Atrimmer 2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E6659–E6667.
- Yang, Z., and Li, Y. (2018). Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Current Opinion in Virology* 32, 88–99.

Yu, Y., Ji, L., Le, B.H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., Gao, L., Liu, C., Cao, X., and Mo, B. (2017). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in Arabidopsis. *PLoS Biology* 15, e2001272.

Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., and Chen, S. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host & Microbe* 7, 290–301.

Annexes

1) Milieu KB à 1l

| | |
|------|---|
| 20g | Proteose Peptone 3 (Tryptone) |
| 1,5g | K ₂ HPO ₄ ou K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O (1,97g) |
| 15g | Glycérol |
| 15g | Agar pour milieu solide |

Après autoclave, ajouter 3,2ml de 1M MgSO₄ stérile

2) Tampon d'extraction des protéines

| | |
|-----------|------------------------|
| 25Mm | Tris-HCl pH=7,5 |
| 1Mm | EDTA |
| 150mM | NaCL |
| 10% | Glycérol |
| 5Mm | DTT |
| 2% | PVPP |
| 1µl/100µl | Inhibiteur de protéase |

3) SDS- PAGE (Gel polyacrylamide)

3-1 Gel séparateur (15%)

| | |
|-------|----------------------------|
| 6,7ml | H ₂ O distillée |
| 5ml | Tris-HCl |
| 8ml | Acrylamide |
| 200µl | SDS 10% |
| 100µl | APS10% |
| 10µl | Temed |

3-2 Gel concentrateur (40%)

| | |
|--------|----------------------------|
| 3,13ml | H ₂ O distillée |
| 1250µl | Tris-HCl |
| 533 µl | Acrylamide |
| 50µl | SDS 10% |
| 25µl | APS10% |
| 10µl | Temed |

4) Tampon de chargement (4X)

| | |
|-------|----------------------------|
| 3ml | H ₂ O distillée |
| 1ml | Tris-HCl |
| 1,6ml | Glycérol |
| 1,6ml | SDS 10% |
| 0,4ml | β-mercaptoethanol 10% |
| 0,4ml | Bromophénol |

5) Tampon de migration (5X) à 1l

| | |
|-----|-----------|
| 15g | Tris-base |
| 72g | Glycine |
| 5g | SDS |

6) Tampon de transfert tris-glycine à 1l

| | |
|-------|----------|
| 2,4g | Tris |
| 11,2g | Glycine |
| 200ml | Méthanol |

7) TBST 10X à 1l (pH=7,5)

| | |
|-----|-----------|
| 80g | NaCl |
| 2g | KCl |
| 30g | Tris-base |
| 5ml | Tween20 |

8) Tampon de blocage

TBST 1X + lait 5%

9) Solution Mix (pour qPCR)

| | |
|----------------------------|------|
| SSoFast 2x (Mix) | 10ul |
| Amorce (F) 10uM | 0,4 |
| Amorce (R) 10uM | 0,4 |
| H ₂ O distillée | 5,2 |

10) Solution mélange sans miARN

| | |
|----------------------------|------------|
| dNTP 10mM | 0,5ul |
| H ₂ O distillée | 11,15ul |
| Amorce TB* | 1ul (1uM) |

11) Solution Mix

| | |
|------------------------------------|------------|
| Tampo 5X | 4ul |
| DTT (0,1M) | 2ul |
| RNaseOUT (40 unités/ul) | 1ul (1uM) |
| SuperScript III RT (200 unités/ul) | 0,25ul |

12) Solution Mix (pour qPCR)

| | |
|----------------------------|------|
| H ₂ O distillée | 12ul |
| SSoFast 2x (Mix) | 4ul |
| Amorce (F) 10uM | 1ul |
| Amorce (R) 10uM | 1ul |

13) Liste des Amorces utilisées

| Gène | Séquences des Amorces |
|----------------|--|
| <i>At-EF1</i> | F : TCTCCGAGTACCCACCTTTG R : TCCTTCTTGTCCACGCTCTT |
| <i>At-RPS5</i> | F : GGTTGATGATCCGATGGAAGT R : GGGTGACTTCCCAGTGTATTT |
| <i>At-PBS1</i> | F : TCAATGTGCATCCAAGAACAGGCG R : AATTTACTTCCCGAGCCACCTCCA |
| <i>At-BIK1</i> | F : ACCGTGTTCTAGTCTACGAG R : ATTGGACCGTCTCTAGCTAG |
| <i>At-PBL1</i> | F : ATCGGACTCTGTTGTTGGAG R : AGAAGCCGTTGTTTCATCTTCC |
| <i>At-PBL2</i> | F : TCCTTCAGGACTAAGCACAAC R : AACCTTCAGGCTTAAGCTGC |
| <i>At-ADF4</i> | F : CACCCTTCATTCTATCTGTCTGG R : CAAAGGAAGCAAACACAGCA |

11) Séquences de petits ARN, Tige boucle, Amorces et Sondes

| | |
|--------------------|--|
| <i>Ath</i> -5.8s | UGCAGACGGACCCACAGUGUU |
| Sonde antisens | AACACTGTGGGTCCGTCTGCA |
| Sonde de détection | TGCAGACGGACCCACAGTGTT |
| Amorce TB* | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACACT |
| Amorce universelle | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| Amorce sens | ACTGCAGACGGACCCAC |

*Tige Boucle

| | |
|--------------------|--|
| Ath-miR472 | AAAAAGGAUGAGGCGGGUAUGG |
| Sonde antisens | CCATACCCGCCTCATCCTTTT |
| Sonde de détection | AAAAAGGATGAGGCGGGTATGG |
| Amorce TB | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCATAC |
| Amorce universelle | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| Amorce sens | ATAAAAAGGATGAGGCGG |

| | |
|--------------------------|--|
| <i>Ath</i> - miR5020a | ACGUUCAGAGUGGAAGAAGGU |
| Sonde antisens | ACCTTCTTCCACTCTGAACGT |
| Sonde de détection | ACG TTCAGAGTGGAAGAAGGT |
| Amorce TB | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCTTC |
| Amorce universelle | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| Amorce sens | GTACCGACG TTCAGAGTGGA |

| | |
|----------------------------|---|
| <i>Ath</i> - miR5632-5p | UGUCAACCUAUUCUCUUAGUU |
| Sonde antisens | AACTAAGAGAATAGGTTGACA |
| Sonde de détection | TGTCAACCTATTCTCTTAGTT |
| Amorce TB | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCTAA |
| Amorce universelle | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| Amorce sens | GGGGCTGTCAACCTATTCTC |

| | |
|---------------------------|---|
| <i>Ath</i> - miR835-5p | CUAUUUCUUGUAUACGUUCUU |
| Sonde antisens | AAGAACGTATACAAGAAATAG |
| Sonde de détection | CTATTCTTGTATACGTTCTT |
| Amorce TB | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAAAGAAC |
| Amorce universelle | GTGCAGGGTCCGAGGT |
| Amorce sens | CCGGGCCTATTCTTGTATAC |

Chapitre 3

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Ce projet a été réalisé dans le but d'étudier le rôle des protéines SDN dans le contrôle de l'homéostasie des miARN pour une meilleure mise en place des réponses immunitaires chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* en réponse à une infection par la souche bactérienne *P. syringae*.

Les protéines SDN sont des exonucléases récemment découvertes et sont donc peu documentées dans la littérature. Ainsi, ce projet est le premier à détailler la voie d'ETI dans laquelle les protéines SDN jouent un rôle dans l'obtention d'une réponse immune optimale chez la plante. En effet, l'infection par la souche de *P. syringae* exprimant différents effecteurs (AvrPphB, AvrRps4, Avrpm1) a permis d'identifier la voie activée par l'effecteur bactérien AvrPphB chez *Arabidopsis* dans laquelle les protéines SDN y jouent un rôle. Ces protéines SDN ne ciblent pas les voies communes d'ETI activées par des effecteurs, mais plutôt une voie unique qui est celle activée par l'effecteur bactérien AvrPphB. Celui-ci étant reconnu par la protéine de résistance RPS5. Ces protéines SDN sont nécessaires dans l'accumulation de certains marqueurs de défense de la voie de ETI à savoir l'AS (hormone de défense) et la PR1 (gène de défense) lorsque la souche de *P. syringae* exprimant l'effecteur AvrPphB infecte la plante. De plus l'accumulation de la protéine RPS5 est aussi inhibée chez le double mutant *sdn1/2*. Ce qui prouve qu'il existerait un ou plusieurs miARN qui contrôlèrent l'accumulation des transcrits de RPS5 et qui sont contrôlés par les protéines SDN. Cependant, il existe cinq protéines SDN et seulement deux ont été testées (SDN 1 et 2) dans notre étude. Idéalement, une mutation de toutes les SDN donnerait une idée plus claire de leur rôle dans la défense de la plante. Néanmoins, les travaux menés dans la littérature ont montré qu'un triple mutant est létal pour la plante. Par contre une étude de ces protéines prises individuellement donnerait une idée de leur rôle distinct.

Concernant les microARN, ceux-ci sont des contributeurs importants pour la mise en place des différents processus biologiques majeurs chez la plante, notamment dans l'immunité et la résistance contre les agents pathogènes. Dans la voie de ETI plusieurs microARN ont été identifiés comme régulant les voies de défense suite à une infection par un virus ou une bactérie. C'est le cas du miR472 aussi étudié dans ce projet a été identifié comme jouant un rôle dans la régulation de ETI. En effet, ce miR472 serait responsable de la sensibilité de la plante à une infection contre *P. syringae* DC3000. En s'associant avec la protéine RDR6, elle contribue à amplifier le phénomène de l'ARN d'interférence pour ainsi réguler négativement l'immunité de la plante (Boccaro *et al.*, 2014). D'autres chercheurs ont également identifiés la famille du miR482 dont l'inhibition entraîne l'accumulation des protéines de résistances LRR1 et LRR2 chez la tomate (Shivaprasad *et al.*, 2012). Un autre exemple de la régulation dans la voie de PTI par les miARN est aussi démontré par l'équipe de Li *et al* (2010). Ces chercheurs ont ainsi démontré l'action d'AGO1 qui peut réguler positivement ou négativement la résistance induite par flg22 contre *P. syringae*. C'est de plus par un séquençage des petits ARN qui lient AGO1 que les chercheurs ont pu identifier le miR160a responsable de la régulation positive du dépôt de callose induit par flg22, alors que miR398b et miR773 régulent négativement ce dépôt de callose (Li *et al.*, 2010). Dans ce projet, la sélection du miR5020 qui cible le transcrit RPS5 s'avèrent être contrôlé par les protéines SDN. Il serait donc fort intéressant de caractériser d'autres transcrits codant et les microARN contrôlés par les protéines SDN avant et après infection. Cette étude serait faite aussi bien chez la plante sauvage *Arabidopsis* que chez la plante mutée au niveau des protéines SDN1 et SDN2. Une extraction des ARN totaux permettant d'obtenir les ARNm et les miARN suivie d'un séquençage à haut débit permettrait ainsi d'obtenir toutes les cibles des protéines SDN. Ces analyses auraient pour but de réaliser une onthologie qui permettrait de déterminer le processus biologique de ces miR et leurs cibles ainsi que leur implication dans l'immunité de la cellule végétale.

Pour conclure, la réalisation de ce projet a permis de démontrer que les protéines SDN contribuent grandement à la résistance des plantes face aux bactéries et qu'elles agissent via la

voie de l'immunité induite par l'effecteur AvrPphB. En effet, ces protéines régulent le niveau d'expression de RPS5, contribuent à l'accumulation de l'AS de même que de son marqueur la PR1. Ainsi ce projet de recherche a permis de disséquer une voie de défense importante chez *Arabidopsis* facilitant la compréhension des mécanismes de défense des plantes. Cette découverte limiterait l'utilisation des produits chimiques néfastes à la santé humaine. En effet, une solution contenant les protéines SDN pourrait être utilisée sur les plantes afin d'activer les voies de défense d'ETI. Cependant, il resterait encore de s'assurer de la solubilité de ces protéines à travers la membrane et de plus, que ces protéines SDN se rendent au bon compartiment afin d'activer l'immunité. De plus, il serait important d'identifier des pathogènes et pathovars dont l'ETI dépend des SDN dans les plantes d'intérêt agricole.

BIBLIOGRAPHIE

Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W. (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2531–2536.

Ali, S., and Bakkeren, G. (2011). Fungal and oomycete effectors–strategies to subdue a host. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33, 425–446.

Alvarez, J.P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., and Eshed, Y. (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *The Plant Cell* 18, 1134–1151.

Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA–directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328, 1534–1539.

Andersen, E., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., and Nepal, M. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes* 9, 339.

Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., and Zeier, J. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 954–971.

Aukerman, M.J., and Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell* 15, 2730–2741.

Becker, A., and Lange, M. (2010). VIGS–genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15, 1–4.

Benhamou, N., and Rey, P. (2012a). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d’écoproduction durable. *Phytoprotection*.

Benhamou, N., and Rey, P. (2012b). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d’écoproduction durable.: I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection* 92, 1–23.

Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1758, 994–1003.

Boccardo, M., Sarazin, A., Thiebauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., and Colot, V. (2014). The *Arabidopsis* miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP-and effector-

triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathogens* *10*, e1003883.

Bonas, U., and Lahaye, T. (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* *5*, 44–50.

Borges, F., and Martienssen, R.A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *16*, 727.

Burgyán, J., and Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* *16*, 265–272.

Campo, S., Peris-Peris, C., Siré, C., Moreno, A.B., Donaire, L., Zytnicki, M., Notredame, C., Llave, C., and San Segundo, B. (2013). Identification of a novel micro RNA (mi RNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the N ramp6 (N atural resistance-associated macrophage protein 6) gene involved in pathogen resistance. *New Phytologist* *199*, 212–227.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642–655.

Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* *303*, 2022–2025.

Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters* *579*, 5923–5931.

Chen, J., Liu, L., You, C., Gu, J., Ruan, W., Zhang, L., Gan, J., Cao, C., Huang, Y., and Chen, X. (2018). Structural and biochemical insights into small RNA 3' end trimming by Arabidopsis SDN1. *Nature Communications* *9*, 3585.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* *18*, 465–476.

Crabill, E., Joe, A., Block, A., Van Rooyen, J.M., and Alfano, J.R. (2010). Plant immunity directly or indirectly restricts the injection of type III effectors by the *Pseudomonas syringae* type III secretion system. *Plant Physiology* *154*, 233–244.

Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J.E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* *66*, 487–511.

Cui, X., Yan, Q., Gan, S., Xue, D., Dou, D., Guo, N., and Xing, H. (2017). Overexpression of gma-miR1510a/b suppresses the expression of a NB-LRR domain gene and reduces resistance to *Phytophthora sojae*. *Gene* *621*, 32–39.

- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A., and Carrington, J.C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 997.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57, 779–795.
- David, L., Harmon, A.C., and Chen, S. (2019). Plant immune responses-from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signaling & Behavior* 1–9.
- DeYoung, B.J., Qi, D., Kim, S.-H., Burke, T.P., and Innes, R.W. (2012). Activation of a plant nucleotide binding-leucine rich repeat disease resistance protein by a modified self protein. *Cellular Microbiology* 14, 1071–1084.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 547–552.
- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol* 31, 105–24.
- El Oirdi, M., El Rahman, T.A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell* 23, 2405–2421.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 366–371.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Academic Press).
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.-A., and Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *The EMBO Journal* 20, 5400–5411.
- Freeman, B.C., and Beattie, G.A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.

- Fu, Z.Q., and Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64, 839–863.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Höhmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H., and Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal* 49, 683–693.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Göhre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 189–215.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 18, 277–284.
- Guest, D., and Brown, J. (1997). Plant defences against pathogens (Rockvale Publications for the Division of Botany, Rockvale Publications for ...).
- Gutierrez, L., Bussell, J.D., Păcurar, D.I., Schwambach, J., Păcurar, M., and Bellini, C. (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell* 21, 3119–3132.
- Häffner, E., Konietzki, S., and Diederichsen, E. (2015). Keeping control: The role of senescence and development in plant pathogenesis and defense. *Plants* 4, 449–488.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8, 1773.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., and Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology* 13, 1824–1837.
- Idnurm, A., and Howlett, B.J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2, 241–255.
- Jin, H. (2008). Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS Letters* 582, 2679–2684.
- Johansson, A., Staal, J., and Dixelius, C. (2006). Early responses in the Arabidopsis-Verticillium longisporum pathosystem are dependent on NDR1, JA-and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 958–969.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323.

- Kamaruzzaman, M., He, G., Wu, M., Zhang, J., Yang, L., Chen, W., and Li, G. (2019). A novel partitivirus in the hypovirulent isolate QT5-19 of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Viruses* 11, 24.
- Kamminga, L.M., Luteijn, M.J., Den Broeder, M.J., Redl, S., Kaaij, L.J., Roovers, E.F., Ladurner, P., Berezikov, E., and Ketting, R.F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *The EMBO Journal* 29, 3688–3700.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60.
- Karppinen, K., Derzsó, E., Jaakola, L., and Hohtola, A. (2016). Molecular cloning and expression analysis of hyp-1 type PR-10 family genes in *Hypericum perforatum*. *Frontiers in Plant Science* 7, 526.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y. (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 1.
- Khan, M., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology* 29, 49–55.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* 24, 1012–1019.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* 147, 1358–1368.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., and Burgyán, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal* 23, 876–884.
- Lal, N.K., Nagalakshmi, U., Hurlburt, N.K., Flores, R., Bak, A., Sone, P., Ma, X., Song, G., Walley, J., and Shan, L. (2018). The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. *Cell Host & Microbe* 23, 485–497.
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M., and Moose, S.P. (2005). microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 9412–9417.
- Lebailly, P., Niez, E., and Baldi, I. (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie* 9, 361–369.

Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystemes et fondements des strategies de lutte* (Bruxelles, BE: Ed. De Boeck Université).

Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 1790–1795.

Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., and Zhou, J.-M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology* *152*, 2222–2231.

Li, Y., Lu, Y.-G., Shi, Y., Wu, L., Xu, Y.-J., Huang, F., Guo, X.-Y., Zhang, Y., Fan, J., and Zhao, J.-Q. (2014). Multiple rice microRNAs are involved in immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Physiology* *164*, 1077–1092.

Liang, X., and Zhou, J.-M. (2018). Receptor-like cytoplasmic kinases: central players in plant receptor kinase-mediated signaling. *Annual Review of Plant Biology* *69*, 267–299.

Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., and Stacey, G. (2007). Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* *20*, 900–911.

Lu, Y.-T., Li, M.-Y., Cheng, K.-T., Tan, C.M., Su, L.-W., Lin, W.-Y., Shih, H.-T., Chiou, T.-J., and Yang, J.-Y. (2014). Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant Physiology* *164*, 1456–1469.

Mbengue, M., Navaud, O., Peyraud, R., Barascud, M., Badet, T., Vincent, R., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2016). Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* *7*, 422.

Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 101–122.

Meng, Y., Ma, X., Chen, D., Wu, P., and Chen, M. (2010). MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *393*, 345–349.

Mengiste, T. (2012). Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* *50*, 267–294.

Mysore, K.S., and Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* *9*, 97–104.

- Nadiya, F., Anjali, N., Thomas, J., Gangaprasad, A., and Sabu, K.K. (2019). Deep sequencing identified potential miRNAs involved in defence response, stress and plant growth characteristics of wild genotypes of cardamom. *Plant Biology* 21, 3–14.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198, 249–266.
- Osbourn, A. (1996). Saponins and plant defence—a soap story. *Trends in Plant Science* 1, 4–9.
- Otulak-Kozielec, K., Kozielec, E., and Lockhart, B. (2018). Plant cell wall dynamics in compatible and incompatible potato response to infection caused by Potato virus Y (PVYNTN). *International Journal of Molecular Sciences* 19, 862.
- Padmanabhan, C., Zhang, X., and Jin, H. (2009). Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 465–472.
- Pieterse, C.M., and Van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 456–464.
- Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and Van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10, 1571–1580.
- Porter, K., Shimono, M., Tian, M., and Day, B. (2012). Arabidopsis Actin-Depolymerizing Factor-4 Links Pathogen Perception, Defense Activation and Transcription to Cytoskeletal Dynamics. *PLoS Pathogens* 8.
- Qi, D., and Innes, R.W. (2013). Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology* 4, 348.
- Qu, F., and Morris, T.J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters* 579, 5958–5964.
- Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321, 1490–1492.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Fröhlich, K., Westphal, L., Scheel, D., and Lee, J. (2014). Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic kinases, PBL1 and BIK1. *BMC Plant Biology* 14, 374.

- Raslan, A.A., Elbadry, S., and Darwish, W.S. (2018). Estimation and human health risk assessment of organochlorine pesticides in raw milk marketed in Zagazig City, Egypt. *Journal of Toxicology*.
- Raynal, R. (2011). les viroïdes virus minima ou survivants du monde à ARN.
- Rogers, K., and Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell* 25, 2383–2399.
- Roossinck, M.J. (2013). Plant virus ecology. *PLoS Pathogens* 9, e1003304.
- roven, M.-T. (2001). Plantes et agents pathogènes, une liaison raffinée et dangereuse: l'exemple des champignons. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences-Series III-Sciences de La Vie* 324, 899–903.
- Rovenich, H., Boshoven, J.C., and Thomma, B.P. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* 20, 96–103.
- Rüegger, S., and Großhans, H. (2012). MicroRNA turnover: When, how, and why. *Trends in Biochemical Sciences* 37, 436–446.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8, 1809.
- Sanei, M., and Chen, X. (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Current Opinion in Plant Biology* 27, 199–206.
- Schafer, W. (1994). Molecular Mechanisms of Fungal Pathogenicity to Plants. *Annual Review of Phytopathology* 32, 461–477.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 1121–1133.
- Shah, J., and Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 4, 30.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W., and Dixon, J.E. (2002). A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575–588.
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A., and Baulcombe, D.C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site–leucine-rich repeats and other mRNAs. *The Plant Cell* 24, 859–874.
- Stakman, E.C. (1915). Relation between Puccinia graminis and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res* 4, 193–200.

- Sun, J., Huang, G., Fan, F., Wang, S., Zhang, Y., Han, Y., Zou, Y., and Lu, D. (2017). Comparative study of Arabidopsis PBS1 and a wheat PBS1 homolog helps understand the mechanism of PBS1 functioning in innate immunity. *Scientific Reports* 7, 5487.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., and Bent, A.F. (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *The Plant Cell* 18, 764–779.
- Swiderski, M.R., Birker, D., and Jones, J.D. (2009). The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 157–165.
- Tian, M., Chaudhry, F., Ruzicka, D.R., Meagher, R.B., Staiger, C.J., and Day, B. (2009). Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB. *Plant Physiology* 150, 815–824.
- Tiwari, M., Sharma, D., and Trivedi, P.K. (2014). Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology* 86, 1–18.
- Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal* 46, 14–33.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 4, 645–656.
- Van Breusegem, F., and Dat, J.F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141, 384–390.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Wang, J., Mei, J., and Ren, G. (2019). Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis and degradation. *Frontiers in Plant Science* 10, 360.
- Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W., and Chen, X.-Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17, 2204–2216.
- Wanitchakorn, R., Harding, R.M., and Dale, J.L. (1997). Banana bunchy top virus DNA-3 encodes the viral coat protein. *Archives of Virology* 142, 1673–1680.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.-B., and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562.
- Wildermuth, M.C., Steinwand, M.A., McRae, A.G., Jaenisch, J., and Chandran, D. (2017). Adapted biotroph manipulation of plant cell ploidy. *Annual Review of Phytopathology* 55, 537–564.
- Wittstock, U., and Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 300–307.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell* 138, 750–759.
- Wu, M.-F., Tian, Q., and Reed, J.W. (2006). Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* 133, 4211–4218.
- Yan, J., Zhao, C., Zhou, J., Yang, Y., Wang, P., Zhu, X., Tang, G., Bressan, R.A., and Zhu, J.-K. (2016). The miR165/166 mediated regulatory module plays critical roles in ABA homeostasis and response in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics* 12, e1006416.
- Yu, Y., Jia, T., and Chen, X. (2017a). The ‘how’ and ‘where’ of plant micro RNA s. *New Phytologist* 216, 1002–1017.
- Yu, Y., Ji, L., Le, B.H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., Gao, L., Liu, C., Cao, X., and Mo, B. (2017b). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in Arabidopsis. *PLoS Biology* 15, e2001272.
- Zamioudis, C., and Pieterse, C.M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 139–150.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., and Chen, S. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a Pseudomonas syringae effector. *Cell Host & Microbe* 7, 290–301.
- Zhang, J., Zhang, H., Srivastava, A.K., Pan, Y., Bai, J., Fang, J., Shi, H., and Zhu, J.-K. (2018). Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development. *Plant Physiology* 176, 2082–2094.
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., and Klessig, D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 191–202.

